

08.10.2004

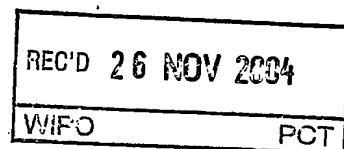
日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年10月 8日
Date of Application:

出願番号 特願2003-350158
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-350158]



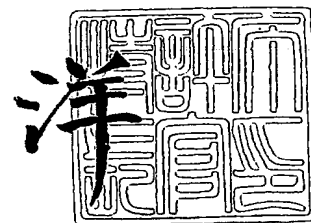
出願人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3101921

【書類名】 特許願
【整理番号】 H15-2061Y2
【提出日】 平成15年10月 8日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/13
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 設楽 研也
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 保坂 絵美
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 夏目 暁人
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 脇谷 雅子
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 内田 和久
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 佐藤 光男
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 大貫 尚子
【特許出願人】
 【識別番号】 000001029
 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社
 【代表者】 松田 譲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 008187
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

結合性蛋白質とN-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体Fc領域との融合蛋白質分子からなる医薬融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物。

【請求項 2】

フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、請求項 1 に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 3】

抗体Fc領域がヒト抗体のIgGクラスである、請求項 1 または 2 に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 4】

抗体Fc領域がヒト抗体のIgG1クラスである、請求項 3 に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 5】

抗体融合蛋白質組成物が、ヒト抗体のIgG1クラス重鎖定常領域ドメイン 2 (CH₂) を含む請求項 4 に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 6】

融合蛋白質組成物が、ヒト抗体ヒンジ領域、抗体のIgG1クラス重鎖定常領域ドメイン 2 (CH₂) および抗体重鎖定常領域ドメイン 3 (CH₃) を含む請求項 5 に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 7】

結合性蛋白質が、抗体の結合性断片、可溶性受容体およびリガンド蛋白質から選ばれる請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 8】

抗体の結合性断片が、一本鎖抗体である請求項 7 に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 9】

一本鎖抗体が、抗体重鎖可変領域 (VH) および可変軽鎖領域 (VL) を含むポリペプチド鎖を少なくとも 1 つ含む請求項 8 に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 10】

一本鎖抗体が、TAG (Tumor-Associated Glycoprotein) -72 に結合性を有する請求項 8 に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 11】

一本鎖抗体が、抗TAG (Tumor-Associated Glycoprotein) -72 抗体の抗体重鎖可変領域 (VH) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2 および CDR3 を含み、可変軽鎖領域 (VL) の CDR1、CDR2 および CDR3 を含む請求項 8～10 のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 12】

一本鎖抗体が、抗TAG (Tumor-Associated Glycoprotein) -72 抗体の重鎖可変領域 (VH) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 9、10 および 11 で示されるアミノ酸配列を含み、可変軽鎖領域 (VL) の CDR1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 12、13 および 14 で示されるアミノ酸配列を含む請求項 8～11 のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 13】

一本鎖抗体が、配列番号 15 で示される重鎖可変領域 (VH)、および/または配列番号 16 で示される可変軽鎖領域 (VL) を含む請求項 8～12 のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 14】

一本鎖抗体が、配列番号 17 で示されるアミノ酸配列を含む請求項 8～13 のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項 15】

可溶性受容体が、可溶性TNF (Tumor necrosis factor) 受容体IIである請求項7に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項16】

可溶性受容体が、配列番号64で示されるアミノ酸配列を含む請求項15に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項17】

リガンド蛋白質が、LFA-3 (leukocyte Function Antigen-3) である請求項7に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項18】

リガンド蛋白質が、配列番号65で示されるアミノ酸配列を含む請求項17に記載の融合蛋白質組成物。

【請求項19】

請求項1～18のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物をコードするDNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項20】

宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失するようにゲノムが改変された細胞である、請求項19に記載の形質転換体。

【請求項21】

宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、請求項19に記載の形質転換体。

【請求項22】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) およびGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (F_x) からなる群から選ばれる酵素である、請求項20または19に記載の形質転換体。

【請求項23】

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) および(b) からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項22に記載の細胞。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA;

(b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項24】

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項22に記載の細胞。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質;

(c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

【請求項25】

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) および(b) からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項22に記載の細胞。

(a) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA;

(b) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

白質をコードするDNA。

【請求項 26】

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)～(c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 22 に記載の細胞。

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項 27】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである請求項 20 または 21 に記載の形質転換体。

【請求項 28】

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)～(d) からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項 27 に記載の細胞。

(a) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNA；

(c) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；

(d) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項 29】

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)～(f) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 27 に記載の細胞。

(a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項 30】

形質転換体がFERM BP-8503である請求項 8～14、19～29のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項 31】

形質転換体がFERM BP-8499により生産される請求項 15、16 または 19～29のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項 32】

形質転換体がFERM BP-8500により生産される請求項 17～29のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項 33】

宿主細胞が、下記の(a)～(i)からなる群から選ばれる細胞である請求項19～32のいずれか1項に記載の形質転換体。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

【請求項 34】

請求項19～33のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、請求項1～18のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物の製造方法。

【請求項 35】

請求項34に記載の製造方法により得られる、請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体融合蛋白質組成物。

【請求項 36】

請求項1～18および35いずれか1項に記載の融合蛋白質組成物を有効成分として含有する医薬。

【請求項 37】

請求項1～18および35のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物を有効成分として含有する医薬が、腫瘍を伴う疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、微生物感染を伴う疾患の予防薬または治療薬。

【請求項 38】

腫瘍を伴う疾患が、血液腫瘍および癌である請求項37に記載の疾患の予防薬または治療薬。

【請求項 39】

炎症性疾患が、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎、Churg-Strauss症候群である請求項37に記載の疾患の予防薬または治療薬。

【請求項 40】

自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、クローン病、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎などの免疫システムが関与する疾患である請求項37に記載の疾患の予防薬または治療薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】融合蛋白質組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、結合性蛋白質とN-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体Fc領域との融合蛋白質分子からなる融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物、該組成物を生産する形質転換体、該組成物の製造法および該組成物からなる医薬品に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体は、その抗原と特異的に結合し、Fc領域に特異的な受容体でエフェクター細胞に発現する細胞膜発現型Fc受容体を介して、ナチュラルキラー細胞、活性化マクロファージ等のエフェクター細胞の細胞障害活性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; 以下、ADCC活性と表記する)を誘導する。

抗体の可変領域は、抗原との特異的結合に関係するドメインである。一方、抗体の定常領域は、抗体分子の安定化や抗体のエフェクター機能を担うドメインである。特に、IgGクラスの抗体Fc領域(抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域)はエフェクター細胞上のFc受容体の一員であるFcγ IIIaを介して、ADCC活性を示す。従って、特定の分子との結合活性を有する蛋白質分子と融合蛋白質は、抗体分子と同様に、特定の分子と結合することができ、かつ、Fc領域が介するADCC活性を持つ。

【0003】

これまでに、種々の融合蛋白質が作製されており、該分子の持つADCC活性について検討されている(非特許文献1)。例えば、抗体に類似した形状の分子として、抗体の重鎖可変領域(以下、VHと表記する)と軽鎖可変領域(以下、VLと表記する)を含む蛋白質分子である一本鎖抗体(以下、scFvと表記する)とFc領域の融合蛋白質がADCC活性を持つことが知られている。例えば、抗TAG-72抗体から作製したscFvとFc領域の融合蛋白質(非特許文献2)はTAG-72陽性細胞に対してADCC活性を持つ。また、メラノーマ患者より作製した抗体のファージライブラリーを、メラノーマ細胞に対してパニングを行うことによって得られたscFvとFcの融合蛋白質はメラノーマ細胞に特異的なADCC活性を示した(非特許文献3)。

【0004】

また、一本鎖抗体以外の抗体Fc領域と融合させることができる結合性蛋白質としては、サイトカイン、ケモカイン、アポトーシス誘導シグナル分子、共刺激分子、増殖因子あるいは分化誘導因子などが知られている。該結合蛋白質の受容体と融合蛋白質は多数報告されており、例えば可溶性腫瘍壊死因子- α 受容体II(以下、sTNFRIIと表記する)と融合蛋白質であるetanercept(特許文献1)、抗原提示細胞上に発現しているlymphocyte function-associated antigen 3(以下、LFA-3と表記する)と融合蛋白質であるalefacept(特許文献2)、Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4)と融合蛋白質(非特許文献4)、インターロイキン-15と抗体Fc領域との融合蛋白質(非特許文献5)、ファクターVIIと融合蛋白質(非特許文献6)、インターロイキン10と融合蛋白質(非特許文献7)、インターロイキン2と融合蛋白質(非特許文献8)、CD40と融合蛋白質(非特許文献9)およびOX40と融合蛋白質(非特許文献10)などが挙げられる。これらの中で、etanercept、alefaceptはすでに医薬品として利用されている。しかしながら、一般に融合蛋白質の標的分子に対する結合活性は抗体の抗原に対する結合活性と比較して低く(非特許文献1、非特許文献11)、医薬品として利用できる融合蛋白質は限られている。特に融合蛋白質により標的分子が発現している細胞数を減少させる治療においては、抗体のFc領域を介したADCC活性の高さがその治療効果に重要である。

【0005】

ADCC活性は、ヒトIgG1サブクラス抗体のFc領域と抗体レセプターとの相互作用を介して

誘導される。抗体とFc γ Rとの結合においては、抗体のヒンジ領域及びC領域の第2番目のドメイン（以下、C γ 2ドメインと表記する）に結合している糖鎖の重要性が示唆されている（非特許文献12）。

抗体IgG分子のFc領域に結合しているN-グリコシド結合複合型糖鎖の非還元末端へのガラクトースの付加、および還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られており（非特許文献13）、特に糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加により、抗体のADCC活性が大きく低下することが報告されている（特許文献3、非特許文献14）。

【0006】

融合蛋白質は、遺伝子組換え技術を利用してされ、動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞などを宿主細胞として製造されているが、発現させた抗体組成物の糖鎖構造は宿主細胞によって異なる。

抗体生産細胞内の α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ（GMD）、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ（Fx）の活性を低下または欠失することにより、Fc領域を有する抗体分子からなる組成物中で、該組成物中に含まれるFc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を増加させることができることが知られている（特許文献4）。

【非特許文献1】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7995(1993)

【非特許文献2】J. Immunol. Methods, 261, 199(2002)

【非特許文献3】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1627(1999)

【非特許文献4】J. Exp. Med., 181, 1869(1995)

【非特許文献5】J. Immunol., 160, 5742(1998)

【非特許文献6】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 12180(2001)

【非特許文献7】J. Immunol., 154, 5590(1995)

【非特許文献8】J. Immunol., 146, 915(1991)

【非特許文献9】Surgery, 132, 149(2002)

【非特許文献10】J. Leu. Biol., 72, 522(2002)

【非特許文献11】J. Pharmacol. Exp. Ther., 301, 418, (2002)

【非特許文献12】Chemical Immunology, 65, 88, (1997)

【非特許文献13】Biochemistry, 36, 130, (1997)

【非特許文献14】J. Biol. Chem., 278, 3466, (2003)

【特許文献1】USP5605690

【特許文献2】USP5914111

【特許文献3】W000/61739

【特許文献4】W002/31140

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、結合性蛋白質分子とN-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体Fc領域との融合蛋白質からなる融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物、該融合蛋白質組成物を生産する形質転換体、該融合蛋白質組成物の製造方法および該融合蛋白質組成物を含有する医薬等を提供することにある。本発明の融合蛋白質は抗体Fc領域のエフェクター機能の増強されており、治療効果が大きく、投与量の減少による患者の負担の軽減が期待される。また、化学療法や放射性同位元素標識抗体などとの併用の必要性が無くなることによる副作用の低減なども期待される。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、以下の（1）～（40）に関する。

(1) 結合性蛋白質とN-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体Fc領域との融合蛋白質分子からなる医薬融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物。

【0009】

(2) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、(1)に記載の融合蛋白質組成物。

(3) 抗体Fc領域がヒト抗体のIgGクラスである、(1)または(2)に記載の融合蛋白質組成物。

【0010】

(4) 抗体Fc領域がヒト抗体のIgG1クラスである、(3)に記載の融合蛋白質組成物。

(5) 抗体融合蛋白質組成物が、ヒト抗体のIgG1クラス重鎖定常領域ドメイン2(CH₂)を含む(4)に記載の融合蛋白質組成物。

(6) 融合蛋白質組成物が、ヒト抗体ヒンジ領域、抗体のIgG1クラス重鎖定常領域ドメイン2(CH₂)および抗体重鎖定常領域ドメイン3(CH₃)を含む(5)に記載の融合蛋白質組成物。

【0011】

(7) 結合性蛋白質が、抗体の結合性断片、可溶性受容体およびリガンド蛋白質から選ばれる(1)～(6)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物。

(8) 抗体の結合性断片が、一本鎖抗体である(7)に記載の融合蛋白質組成物。

(9) 一本鎖抗体が、抗体重鎖可変領域(VH)および可変軽鎖領域(VL)を含むポリペプチド鎖を少なくとも1つ含む(8)に記載の融合蛋白質組成物。

【0012】

(10) 一本鎖抗体が、TAG (Tumor-Associated Glycoprotein) -72に結合性を有する(8)に記載の融合蛋白質組成物。

(11) 一本鎖抗体が、抗TAG (Tumor-Associated Glycoprotein) -72抗体の抗体重鎖可変領域(VH)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2およびCDR3を含み、可変軽鎖領域(VL)のCDR1、CDR2およびCDR3を含む(8)～(10)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物。

【0013】

(12) 一本鎖抗体が、抗TAG (Tumor-Associated Glycoprotein) -72抗体の重鎖可変領域(VH)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含み、可変軽鎖領域(VL)のCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む(8)～(11)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物。

【0014】

(13) 一本鎖抗体が、配列番号15で示される重鎖可変領域(VH)、および/または配列番号16で示される可変軽鎖領域(VL)を含む(8)～(12)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物。

(14) 一本鎖抗体が、配列番号17で示されるアミノ酸配列を含む(8)～(13)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物。

【0015】

(15) 可溶性受容体が、可溶性TNF (Tumor necrosis factor) 受容体IIである(7)に記載の融合蛋白質組成物。

(16) 可溶性受容体が、配列番号64で示されるアミノ酸配列を含む(15)に記載の融合蛋白質組成物。

(17) リガンド蛋白質が、LFA-3 (leukocyte Function Antigen-3) である(7)に記載の融合蛋白質組成物。

【0016】

(18) リガンド蛋白質が、配列番号65で示されるアミノ酸配列を含む(17)に記載の融合蛋白質組成物。

(19) (1)～(18)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物をコードするDNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(20) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失するようにゲノムが改変された細胞である、(19)に記載の形質転換体。

【0017】

(21) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、(19)に記載の形質転換体。

(22) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) およびGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) からなる群から選ばれる酵素である、(20)または(19)に記載の形質転換体。

【0018】

(23) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の(a)および(b)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、(22)に記載の細胞。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA;

(b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0019】

(24) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の(a)、(b)および(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、(22)に記載の細胞。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質;

(c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

【0020】

(25) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の(a)および(b)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、(22)に記載の細胞。

(a) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA;

(b) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0021】

(26) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の(a)～(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、(22)に記載の細胞。

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質;

(c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質

質。

【0022】

(27) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである(20)または(21)に記載の形質転換体。

(28) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(d)からなる群から選ばれたDNAがコードする蛋白質である、(27)に記載の細胞。

【0023】

- (a) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNA;
- (b) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNA;
- (c) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA;
- (d) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0024】

(29) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(f)からなる群から選ばれた蛋白質である、(27)に記載の細胞。

- (a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (d) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (e) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (f) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

【0025】

(30) 形質転換体がFERM BP-8503である(8)~(14)、(19)~(29)のいずれか1項に記載の形質転換体。

(31) 形質転換体がFERM BP-8499により生産される(15)、(16)または(19)~(29)のいずれか1項に記載の形質転換体。

(32) 形質転換体がFERM BP-8500により生産される(17)~(29)のいずれか1項に記載の形質転換体。

【0026】

(33) 宿主細胞が、下記の(a)~(i)からなる群から選ばれた細胞である(19)~(32)のいずれか1項に記載の形質転換体。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞;
- (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞;
- (c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞;
- (d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞;
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞;
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞;
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞;
- (h) 胚性幹細胞;
- (i) 受精卵細胞。

【0027】

(34) (19) ~ (33) のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、(1) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物の製造方法。

(35) (34) に記載の製造方法により得られる、(1) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の抗体融合蛋白質組成物。

【0028】

(36) (1) ~ (18) および (35) のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物を有効成分として含有する医薬。

(37) (1) ~ (18) および (35) のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物を有効成分として含有する医薬が、腫瘍を伴う疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、微生物感染を伴う疾患の予防薬または治療薬。

【0029】

(38) 腫瘍を伴う疾患が、血液腫瘍および癌である (37) に記載の疾患の予防薬または治療薬。

(39) 炎症性疾患が、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎、Churg-Strauss 症候群である (37) に記載の疾患の予防薬または治療薬。

(40) 自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、クローン病、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎などの免疫システムが関与する疾患である (37) に記載の疾患の予防薬または治療薬。

【発明の効果】**【0030】**

本発明により、結合性蛋白質と N-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体 Fc 領域との融合蛋白質分子からなる医薬融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物、該融合蛋白質組成物を生産する形質転換株、該融合蛋白質組成物の製造方法および該融合蛋白質組成物を含有する医薬が提供される。

【0031】

本発明の融合蛋白質組成物は、特定の生体内物質が発現している細胞を傷害する活性が高いので、特定のマーカー分子を細胞表面に発現している細胞が病態に関与している疾患の治療のための医薬として臨床上有用である。

【発明を実施するための最良の形態】**【0032】**

本発明の結合性蛋白質と N-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体 Fc 領域との融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合しない糖鎖である融合蛋白質組成物としては、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖を抗体 Fc 領域に有する融合蛋白質組成物があげられる。

【0033】

本発明において抗体 Fc 領域としては、抗体エフェクター活性を有する抗体サブクラスの抗体由来の Fc 領域であればよく、医薬品としての利用の点から、好ましくはヒト IgG クラス由来の抗体 Fc 領域が、特に好ましくはヒト IgG1 クラス由来の抗体 Fc 領域が用いられる。IgG クラス抗体由来の抗体 Fc 領域とは、重鎖定常領域ドメイン 2 (以下、CH₂と記す) ドメイン 3 (以下、CH₃と記す) を含むポリペプチド鎖のことをいう。

【0034】

抗体エフェクター活性としては、抗体依存性細胞障害活性 (以下、ADCC 活性と記す) あるいは補体依存性細胞障害活性 (以下、CDC 活性と表記する) などがあげられる。ADCC 活性は、抗体 Fc 領域と抗体 Fc 受容体である Fc γ IIIa 受容体とが結合して発現される細胞障害活性である。CDC 活性は、抗体の可変領域と結合した抗原を補体成分が除去する作用である。

【 0 0 3 5 】

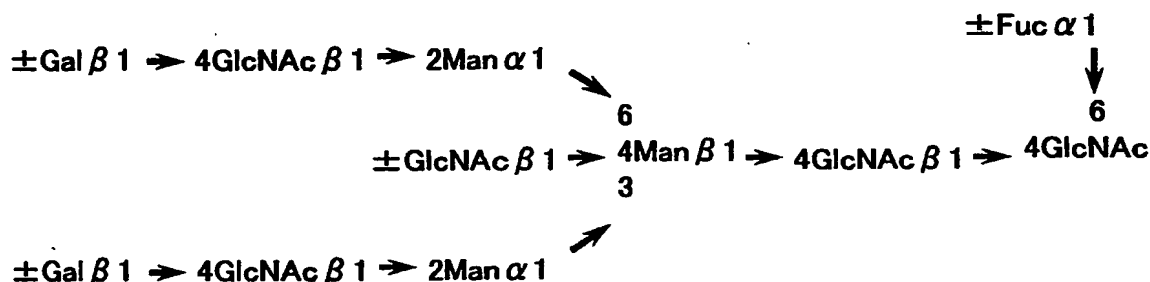
抗体Fc領域には、N-グリコシド結合糖鎖が結合する。従って、Fc融合蛋白質の1ポリペプチド鎖につき1本の糖鎖が結合している。N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の側鎖を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどを有するコンプレックス型（複合型）糖鎖を挙げることができる。

【 0 0 3 6 】

本発明において、N-グルコシド結合複合型糖鎖としては、下記化学式1で示される。

【0037】

【化1】



【 0 0 3 8 】

本発明において、フコースが結合する糖鎖としては、上記で示された化学式中のフコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端側のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合している糖鎖があげられ、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものであってもよい。

本発明において、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないとは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していない融合蛋白質組成物とは、具体的には、後述の4に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度の融合蛋白質組成物である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定の実出限界以下であることを意味する。糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない本発明の融合蛋白質組成物は、高いADCC活性を有する。

【 0 0 3 9 】

N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する融合蛋白質分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する融合蛋白質分子の割合は、融合蛋白質分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法23—糖蛋白質糖鎖研究法(学会出版センター)高橋禮子編(1989)]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖をHPAED-PAD法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー(J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)]によって分析することによって決定することができる。

【0040】

本発明で用いられる結合性蛋白質としては、特定の生体内物質と特異的に結合できる蛋白質があげられる。特定の生体内物質としては、蛋白質性の高分子、糖鎖、細胞膜の構成成分などの疾患の病変細胞の表面に疾患特異的に発現している生体内物質があげられる。具体的には、種々の腫瘍細胞に特異的に発現する受容体、ガングリオシド、膜アンカー型抗体、膜アンカー型酵素などがあげられる。

【0041】

特異的に結合するとは、結合性蛋白質が結合できる生体内物質が特定されていることをいい、一般的には1種類の結合性蛋白質は数種類の物質に、好ましくは2～3種類の物質に、より好ましくは1種類の物質にしか結合できないことをいう。

また、本発明の結合性蛋白質としては、具体的には、抗体、抗体の結合性断片、受容体のリガンド、可溶性の受容体、核酸結合蛋白質、細胞膜結合蛋白質、脂質結合蛋白質、脂肪酸結合蛋白質、糖あるいは糖鎖結合蛋白質、酵素の基質のドミナントネガティブ体および酵素のドミナントネガティブ体などがあげられるが、抗体、抗体の結合性断片、受容体のリガンドおよび可溶性の受容体などが好適に用いられる。

【0042】

本発明に用いられる抗体としては、疾患の病変細胞あるいは病変細胞の表面に発現している生体内物質に特異的に反応するモノクローナル抗体があげられる。モノクローナル抗体は、アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニユアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, (1998)に記載の公知の方法、生体から取得した抗体産生細胞を不死化して株化する方法および人工の抗体ファージライブラリーから、パンニングにより抗体および抗体遺伝子を選択するファージディスプレイ法などにより取得することができる。

【0043】

本発明において、結合性蛋白質として抗体の結合性断片を用いることができる。該抗体の結合性断片は、上記のモノクローナル抗体から、消化酵素を用いて消化する方法、あるいは該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抗体をコードする遺伝子を取得し、蛋白質工学的手法を用いる方法により、作製することができる。

抗体の結合性断片としては、抗体の可変領域の一部あるいは全部を含み、該抗体に対応する抗原への結合活性を保持した結合性断片があげられる。抗体の可変領域の一部を含む抗体断片は、必要に応じて、好みの形状で発現させるように設計でき、抗体Fc領域と連結するために適当なアミノ酸配列を挿入することもできる。非ヒト動物由来の抗体であれば、フレームワークのアミノ酸配列をヒト抗体由来の配列と置換して、免疫原性を低くすることも可能である。抗体の結合性断片としては、以下に示す、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどがあげられる。

【0044】

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち(H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

Fabは、抗体分子を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体分子のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

【0045】

F(ab')₂は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち(H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される)、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

F(ab')₂は、抗体分子を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

【0046】

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

Fab'は、F(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、

Fab'を製造することができる。

【0047】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと記す）を用いて、VH-P-VLないしはVL-P-VHの順で連結されたポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

scFvは、抗体分子のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFvを製造することができる。

【0048】

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。Diabodyが持つ二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

diabodyは、抗体分子のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAをPのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabodyを製造することができる。

【0049】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法（Protein Engineering, 7, 697-704, 1994）に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

dsFvは、抗体分子のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

【0050】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

CDRを含むペプチドは、抗体分子のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。

【0051】

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoC法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の融合蛋白質組成物に用いられる抗体の結合性断片としては、scFvが好適に用いられる。scFvは、一種類の抗体由来のscFvであってもよいし、二種類の抗体由来の二種類のscFvを一本のポリペプチド鎖として発現させ、一本のポリペプチド鎖中に二種類の結合特異性を有するscFvであってもよい。具体的には、癌細胞の表面抗原として知られているTAG-72に対するマウスモノクローナル抗体から作製された、配列番号17で示されるアミノ酸配列を有するscFvがあげられる。

【0052】

本発明において、受容体のリガンドとしては、ヒト体内の細胞表面に発現している受容体のリガンド分子があげられる。該リガンドは該リガンドに対応する特定の受容体に結合可能であれば、該受容体の活性には影響されない。即ち、リガンドの結合により該受容体が介在する情報伝達経路が活性化されても良いし、該情報伝達系を不活化してもよい。リガンドの結合により受容体が介在する情報伝達系が活性化されるリガンドとは、野生型リガンドまたはアゴニスト活性を有するペプチドなどがあげられる。リガンドの結合により

受容体が介在する情報伝達系を不活化させるリガンドとは、野生型リガンドのドミナントネガティブ体またはアンタゴニスト活性を有するペプチドなどがあげられる。

【0053】

本発明の抗体Fc領域としては、Fc γ IIIa受容体との結合に直接関与している抗体重鎖定常領域ドメイン2（以下、CH₂と記す）が少なくとも1つ含まれていればよい。

本発明の融合蛋白質組成物としては、例えば、以下の(a)～(f)があげられる。本発明の融合蛋白質組成物は、単量体、ホモ二量体およびヘテロ二量体を形成していてもよい。以下において、CH₂および抗体重鎖定常領域ドメイン3（以下、CH₃と記す）は、ヒトIgG1クラスであることが好ましい。

- (a) 結合性蛋白質-CH₂；
- (b) 結合性蛋白質-CH₂-CH₃；
- (c) CH₂-結合性蛋白質；
- (d) CH₂-CH₃-結合性蛋白質；
- (e) 結合性蛋白質-CH₂-結合性蛋白質；
- (f) 結合性蛋白質-CH₂-CH₃-結合性蛋白質；

上記(e)および(f)の連結されたポリペプチド鎖において、1つのポリペプチド鎖中に2つの結合性蛋白質のポリペプチド鎖が含まれている融合蛋白質の場合には、2つの結合性蛋白質が結合できる生体内物質は同一でも、異なってもよい。

【0054】

本発明において、融合蛋白質は(a)～(f)の各蛋白質を構成要素として結合したものであってもよい。ここで各構成要素は同一であっても、異なっても、よく、同一の順番の繰り返しでもよい。(a)～(f)の各構成要素の間は、直接各構成要素を連結してもよいし、抗体定常領域に由来するヒンジ配列などのリンカーを介して結合してもよい。さらに、結合性蛋白質の結合特異性および抗体Fc領域のエフェクター活性に大幅な変化を生じない程度に、各構成要素のアミノ酸残基に1つ以上のアミノ酸を付加、欠失および／または置換させてもよい。

【0055】

本発明の形質転換体としては、融合蛋白質分子をコードするDNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体であって、本発明の融合蛋白質組成物を生産する形質転換体であればいかなる形質転換体でも包含される。具体的な例としては、融合蛋白質分子をコードするDNAを以下の(a)または(b)などの宿主細胞に導入して得られる形質転換体があげられる。

- (a) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性が欠失するようにゲノムが改変された細胞；
- (b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失するようにゲノムが改変された細胞。

【0056】

上述において、ゲノムが改変された細胞としては、具体的にはゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ(GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ(Fx)などがあげられる。

【0057】

GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼとしては、

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；
 - (b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- などがあげられる。

【0058】

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

- (a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
 - (b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；
 - (c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；
- などがあげられる。

【0059】

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

- (a) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA；
 - (b) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- などがあげられる。

【0060】

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

- (a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
 - (b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；
 - (c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；
- などがあげられる。

【0061】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼがあげられる。

本発明において、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)または(d)のDNAがコードする蛋白質、

- (a) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNA
 - (b) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNA
 - (c) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA
 - (d) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA
- または、
- (e) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質
 - (f) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質
 - (g) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
 - (h) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
 - (i) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
 - (j) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

等があげられる。

【0062】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号1または3で表される塩基配列を有するDNA、配列番号1または3で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAなどがあげられる。

【0063】

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号5または6で表される塩基配列を有するDNA、配列番号5または6で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAなどがあげられる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1、3、5または6で表される塩基配列からなるDNAなどのDNAまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1、3、5または6で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0064】

本発明において、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質、または配列番号7または8で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号1、3、5または6で表される塩基配列を有するDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

【0065】

また、本発明において配列番号2、4、7または8であらわされるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性、または α 1,6-フコシル

トランスフェラーゼ活性を有する蛋白質としては、具体的には、それぞれ配列番号2、4、7または8で表されるアミノ酸配列とBLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する蛋白質などをあげることができる。

【0066】

また、本発明に用いられる宿主細胞、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失した宿主細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を欠失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を欠失させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法などがあげられる。

【0067】

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)、エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin) 等を挙げることができる。

【0068】

レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細胞を言う。有効濃度とは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞（以下、親株とも称す）が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞が成育できない濃度と同濃度、より好ましくは2〜5倍、さらに好ましくは10倍、最も好ましくは20倍以上である。

【0069】

生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよく、通常のレクチンの有効濃度は10 μ g/mL〜10mg/mL、好ましくは0.5mg/mL〜2.0mg/mLである。

本発明の融合蛋白質組成物を生産させる宿主細胞としては、本発明の融合蛋白質分子を発現できる上記宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞としては、後述1に記載のものがあげられ、特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエローマ細胞株NS0細胞、マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

【0070】

本発明の形質転換株としては、具体的には、本発明のTAG (Tumor-Associated Glycoprotein) -72に結合性を有する融合蛋白質の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞株CHO/DG44細胞の形質転換株KC1200、可溶性TNF (Tumor necrosis factor) 受容体IIの融合蛋白質の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞株CHO/DG44細胞の形質転換株KC1194およびLFA-3 (leukocyte Function Antigen-3) の融合蛋白質の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞

胞株CHO/DG44細胞の形質転換株KC1198があげられる。なお、上記のCHO細胞株CHO/DG44細胞の形質転換株は、平成15年9月30日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6）に、KC1194はFERM BP-8499として、KC1198はFERM BP-8500として、また、平成15年10月3日付けでKC1200はFERM BP-8503として寄託されている。

【0071】

本発明の融合蛋白質組成物は、腫瘍を伴う疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、微生物感染を伴う疾患の予防薬または治療薬として用いることができる。

腫瘍を伴う疾患としては、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病等の急性白血病、リンパ腫、成人T細胞白血病、慢性白血病等の白血病、骨髄腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫などの血液腫瘍および癌などの悪性腫瘍が含有される。

【0072】

炎症性疾患としては、急性あるいは慢性の気道過敏性や気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などの炎症性疾患、慢性副鼻腔炎、Churg-Strauss症候群などの炎症性疾患が包含される。

自己免疫疾患としては、慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、クローン病、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、メモリーT細胞による抗原提示が関与する免疫システム異常に起因する疾患が包含される。メモリーT細胞とは、主にCD45RO陽性を示す活性化T細胞を示し、抗原提示細胞（APC）より抗原の情報を受け取り、免疫システムを活性化する細胞群を示す。

【0073】

循環器疾患としては、動脈硬化症、虚血性心疾患、心臓弁膜症、高血圧、脳卒中、腎不全、大動脈瘤、閉塞性動脈硬化症、原発性肺高血圧症が含有される。

微生物感染を伴う疾患としては、レトロウイルスのヒトT細胞ウイルスI型（HTLV-I）、肝炎ウイルス、エプスタイン-バー（EB）ウイルス、カポジ肉腫関連ウイルス、肝炎ウイルス等の感染によるウイルス性感染症、ブドウ球菌、レンサ球菌、肺炎球菌等の感染による細菌性感染症、白癬菌等の感染による真菌感染症が含有される。

【0074】

以下に、本発明の融合蛋白質組成物を生産する細胞の作製方法、本発明の融合蛋白質組成物の製造方法および本発明の融合蛋白質組成物の分析方法ならびに利用方法について説明する。

1. 本発明の融合蛋白質組成物を生産する宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質を生産する細胞（以下、本発明の細胞と称す）は、以下に述べる手法により、本発明の融合蛋白質組成物を生産するために用いる宿主細胞を作製し、該宿主細胞に後述2に記載の方法により、融合蛋白質をコードする遺伝子を導入することにより、作製することができる。

（1）酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ（以下、GMDと表記する）、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ（以下、Fxと表記する）などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

【0075】

ここでいう遺伝子とは、DNAまたはRNAを含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であ

ホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

【0086】

また、全RNAからpoly(A)⁺ RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) 等があげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社) などの市販のキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

【0087】

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989) 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社) を用いる方法などがあげられる。

【0088】

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ ZAP II (STRATAGENE社)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ (DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、λ TriplEx (Clontech社)、λ ExCell (Pharmacia社)、pT7T31 8U (Pharmacia社)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

【0089】

cDNAライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichia coli XL 1-Blue MRF' [STRATAGENE社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] およびEscherichia coli JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0090】

cDNAライブラリーは、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げて、完全長cDNAを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン (Gene), 138, 171 (1994); ジーン (Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング (羊土社) (1996); 遺伝子ライブラリーの作製法 (羊土社) (1994)] を用いて調製して以下の解析に用いてもよい。

【0091】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'末端および3'末端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖

鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

【0092】

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

【0093】

該遺伝子断片をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) 等を用いて、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することができる。

【0094】

また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを使用し、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いて増幅することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを取得することもできる。

【0095】

取得した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0096】

決定したcDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、取得したDNAがデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

【0097】

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号1または3に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られるN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号5または6に記載の塩基配列があげられる。

【0098】

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機

del 392 (Perkin Elmer社製) 等のDNA合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを取得することもできる。

【0099】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

ゲノムDNAの調製方法

ゲノムDNAを調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems社) やUniversal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを取得することもできる。

【0100】

取得した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0101】

決定したゲノムDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、取得したDNAがデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

【0102】

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機model 392 (Perkin Elmer社製) 等のDNA合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを取得することもできる。

【0103】

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列としては、例えば配列番号9、10、11および12に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られるN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列としては、例えば配列番号13に記載の塩基配列があげられる。

【0104】

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の融

合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

【0105】

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、公知の方法またはDNA合成機により調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAおよびゲノムDNAの塩基配列のうち、連続した5~150塩基、好ましくは5~60塩基、より好ましくは10~40塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成して調製することができる。

【0106】

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴRNAおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

(b) 相同組換え法による本発明の融合蛋白質組成物を作製するための宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用いて染色体を改変することによって作製することができる。

【0107】

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)（以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す）、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford

University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)（以下、「ES細胞を用いた変異マウスの作製」と略す）等に記載の方法を用い、例えば以下に行うことができる。

【0108】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する。

ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子（例えば、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子）を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

【0109】

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、染色体上の標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0110】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、上記1の(1)の(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号9、10、11および12に記載の塩基配列があげられる。

【0111】

上記の方法で得られるN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号13に記載の塩基配列があげられる。

染色体上の標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、置換型、挿入型いずれでも用いることができる。

【0112】

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)やPCR法[ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)]等があげられる。

【0113】

(c) RDO方法による本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製
本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

【0114】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAあるいはゲノムDNAを上記1の(1)の(a)に記載の方法を用い、調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

【0115】

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵

素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのRDOのコンストラクトを設計し合成する。

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

【0116】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0117】

各種宿主細胞へのRDOの導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載のcDNAの調製方法などがあげられる。

【0118】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(b)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

DNAの塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにサブクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

【0119】

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

【0120】

また、前記1の(1)の(a)に記載の、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述1の(5)に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述4または後述5に記載の産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

【0121】

RDOは、サイエンス (Science), 273, 1386 (1996); ネイチャー・メディシン (Nature Medicine), 4, 285 (1998); ヘパトロジー (Hepatology), 25, 1462 (1997); ジーン・セラ

ピー(Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829 (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768 (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323 (1999); インベステイゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dermatol.), 111, 1172 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43 (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555 (2000)等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi法による本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

【0122】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを上記1の(1)の(a)に記載の方法を用い、cDNAを調製する。

調製したcDNAの塩基配列を決定する。

決定したcDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのRNAi遺伝子进行を設計する。

【0123】

該RNAi遺伝子を細胞内で発現させるために、調製したcDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生した融合蛋白質分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

【0124】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0125】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体への組み込みが可能で、設計したRNAi遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述2に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0126】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、

本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

【0127】

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載されたcDNAの調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

【0128】

RNAi遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。RNAi遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー(Nature), 391, 806 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502 (1998); ネイチャー(Nature), 395, 854 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049 (1999); セル(Cell), 95, 1017 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959 (1998); ネイチャー・セル・バイオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70 (2000)]等の記載に従って設計することができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生した融合蛋白質分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

【0129】

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子に突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

【0130】

外来遺伝子としては、宿主細胞のDNAに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述 2 に記載の各種

宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0131】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fxなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

【0132】

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMDを例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来のGMDの立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸(133番目のトレオニン、135番目のグルタミン酸、157番目のチロシン、161番目のリシン)が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている(Structure, 8, 2, 2000)。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMDの補酵素NADPや基質であるGDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMDの酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来のGMDのドミナントネガティブ体の作製の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO細胞由来のGMD(配列番号2)では、155番目のトレオニン、157番目のグルタミン酸、179番目のチロシン、183番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

【0133】

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子(以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する)を用い、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

【0134】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾

に關与する酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長DNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

【0135】

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性、あるいは產生した融合蛋白質分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

【0136】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0137】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述2に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0138】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1の(5)に記載の方法があげられる。產生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(3) 酵素に突然変異を導入する手法

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の遺伝子に突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

【0139】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素としては、具体的には、GMD、Fxなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性を指標と

して所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

【0140】

突然変異誘発処理としては、親株の細胞のDNAに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版(朝倉書店)日本組織培養学会編(1996)、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 24, 314, (2000)等に記載の方法を挙げることができる。

【0141】

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。産生融合蛋白質分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項の1の(5)に記載の方法があげられる。

(4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンスRNA/DNA技術[バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術[Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)]等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

【0142】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fxなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

【0143】

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識

するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

【0144】

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.) , 12, 51 (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (LensCulinaris由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin) 、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin) 、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (Aleuriaaurantia由来のLectin) 等を挙げる事ができる。

【0145】

具体的には、 $1\mu\text{g/mL}$ ~ 1mg/mL の濃度の上述のレクチンを含む培地で1日~2週間、好ましくは1日~1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養容器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

2. 融合蛋白質組成物の製造方法

融合蛋白質組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993 (以下、モノクローナルアンチボディズと略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 (以下、アンチボディエンジニアリングと略す) 等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

【0146】

本発明の融合蛋白質分子の全長cDNAを調製し、該融合蛋白質分子をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、発現ベクターを作製する。

該発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、融合蛋白質分子を生産する形質転換体を得ることができる。

【0147】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

融合蛋白質分子のFc領域に結合するN-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失した細胞を選択するか、または前述1に示された種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

【0148】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、目的とする融合蛋白質分子をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNAは、前記1. の(1)の(a)に記載のcDNAの調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする融合蛋白質分子に特異的なプローブまたはプライマー等を用いて調製することができる。

【0149】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【0150】

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

発現ベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソツズ・イン・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

【0151】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平2-227075]、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社)、pREP4 (Invitrogen社)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

【0152】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0153】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

発現ベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平2-227075]、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第2606856、特許第2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 [マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版]等をあげることができる。

【0154】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレ

キユラー・バイオロジ－Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオ／テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、発現ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

【0155】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

【0156】

昆虫細胞としては、Spodopterafrugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジ－Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusianiの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記発現ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【0157】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

【0158】

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

発現ベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium) [特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法[特開昭60-251887]、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法[日本特許第2606856、日本特許第2517813]等をあげることができる。

【0159】

融合蛋白質遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質の発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された融合蛋白質分子を得ることができる。

【0160】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、融合蛋白質組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0161】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0162】

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0163】

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0164】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [サイエンス(Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [ヴェウロロジー(Virology), 8, 396 (1959)]、199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオリジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten培地[発生工学実験マニュアル・トランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0165】

培養は、通常pH6.0～8.0、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社)、ExCell 400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium [ネイチャー(Nature), 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0166】

培養は、通常pH6.0～7.0、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用さ

れているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

【0167】

培養は、通常pH5.0~9.0、20~40℃の条件下で3~60日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、融合蛋白質分子をコードするDNAを組み込んだ発現ベクターを保持する酵母、動物細胞、昆虫細胞あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物より融合蛋白質組成物を採取することにより、融合蛋白質組成物を製造することができる。

【0168】

融合蛋白質遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

融合蛋白質組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる融合蛋白質分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0169】

融合蛋白質組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227

(1989); ジーン・デベロップメント(Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該融合蛋白質組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0170】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、融合蛋白質分子をコードするDNA、および融合蛋白質分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードするDNAを挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に融合蛋白質分子を発現させることにより、目的とする融合蛋白質分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0171】

融合蛋白質分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された融合蛋白質組成物は、例えば融合蛋白質組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学 (株) 製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、融合蛋白質組成物の精製標品を得ることができる。

【0172】

また、融合蛋白質組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回

収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として融合蛋白質組成物の不溶体を回収する。回収した融合蛋白質組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該融合蛋白質組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該融合蛋白質組成物の精製標品を得ることができる。

【0173】

融合蛋白質組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該融合蛋白質組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、融合蛋白質組成物の精製標品を得ることができる。

以下に、本発明の融合蛋白質組成物の具体的な製造方法について説明する。

(1) 融合蛋白質発現用ベクターの構築

融合蛋白質発現用ベクターとは、ヒト抗体のCH等をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHなどをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0174】

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC γ 1と表記する）及びヒト抗体のL鎖の κ クラスのC領域（以下、hC κ と表記する）等があげられる。

ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成るゲノムDNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。

【0175】

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の定常領域をコードする遺伝子を組み込み発現できる発現ベクターが用いられる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

【0176】

融合蛋白質発現用ベクターは、発現させる融合蛋白質の形状に合った形のベクターを用いればよく、例えば、抗体のFc領域に抗体H鎖及びL鎖の両方を用いる場合には、抗体H鎖及びL鎖がそれぞれ別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができる。融合蛋白質発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での融合蛋白質のH鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。タンデム型の融合蛋白質発現ベクターとしては、pKANTEX93 [モレキュラー・イムノロジー (Mol. Immunol.), 37, 1035 (2000)]、pEE18 [ハイブリドーマ (Hybridoma), 17, 559 (1998)] などがあげられる。

【0177】

構築した融合蛋白質発現用ベクターは、本発明の融合蛋白質の動物細胞での発現に使用できる。

(2) 結合性蛋白質をコードするcDNAの取得

結合性蛋白質をコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

例えば、結合性蛋白質が一本鎖抗体である場合には、抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として用い、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のC領域或いはV領域をコードするDNAをプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びVLをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

【0178】

また、結合性蛋白質が、蛋白質性のリガンドまたは可溶性の受容体である場合には、該結合性蛋白質を発現することが知られている細胞株または組織から、上記と同様の方法でcDNAを取得することができる。

細胞または組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

【0179】

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法などがあげられる。

【0180】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレック・アシッツ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ ZAP II (Stratagene社製)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

【0181】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0182】

cDNAライブラリーからの目的の結合性蛋白質をコードするcDNAクローンを選択する方法としては、アイソトープ或いは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリ

ダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、cDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] により目的の結合性蛋白質をコードするcDNAを調製することもできる。

【0183】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377 DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【0184】

さらに、結合性蛋白質のアミノ酸配列または該蛋白質をコードするDNAの塩基配列がすでに公知である場合には、以下の方法を用いても製造することができる。

アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して該可変領域をコードするDNA配列を設計し、設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うことによりDNAを得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うことによりDNAを得ることができる。

(3) 結合性蛋白質のアミノ酸配列の解析

決定した塩基配列から結合性蛋白質の全アミノ酸配列を推定し、既知のデータベース (Genbank, Swiss Prot) で結合性蛋白質の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得したcDNAが目的とする結合性蛋白質の完全長を含んでいるかを確認することができる。

(4) 融合蛋白質をコードするcDNAの構築

融合蛋白質をコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、構築する融合蛋白質の形状に従って、アミノ酸一次配列を設計する。設計したアミノ酸配列は、コドンユセージを考慮に入れて、DNA配列に変換する。変換したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを設計、合成し、それらをPCR法により連結させ、目的のDNA配列を構築することができる。

【0185】

融合蛋白質の形状によって、結合蛋白質をコードするcDNAのみを上記の方法で作成し、抗体定常領域をコードするcDNAを持つ発現ベクターに導入し、所望の融合蛋白質発現ベクターを構築できる。また、結合性蛋白質と抗体Fc領域とが連結した形でcDNAを上記の方法で構築し、適当な発現ベクターのプロモーター下に挿入して、所望の融合蛋白質発現ベクターを構築することも可能である。

(5) 融合蛋白質発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHあるいはCLをコードする遺伝子上流に、本項2の(4)で構築した融合蛋白質をコードするcDNAを挿入し、融合蛋白質発現ベクターを構築することができる。例えば、本項2の(4)で融合蛋白質を構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト

、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により融合蛋白質組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が融合蛋白質分子を発現する能力を有する場合には、上記 1 に記載した方法を用いて融合蛋白質分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする融合蛋白質組成物を精製することにより、本発明の融合蛋白質組成物を製造することができる。

3. 融合蛋白質組成物の活性評価

精製した融合蛋白質組成物の蛋白量、抗原との結合活性あるいはエフェクター機能を測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

【0191】

その具体的な例としては、融合蛋白質組成物が融合蛋白質の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定することにより、評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

【0192】

ADCC活性は、NK細胞、好中球、単球、マクロファージなどのエフェクター細胞の活性化の結果、生じると考えられており、中でもNK細胞が、主要な役割を果たしている [ブラッド (Blood), 76, 2421 (1990)、トレンドズ・イン・イムノロジー (Trends in Immunol.), 22, 633 (2001)、インターナショナル・レビューズ・オブ・イムノロジー (Int. Rev. Immunol.), 20, 503 (2001)]。

【0193】

NK細胞上に発現しているFcγRはFcγRIIIaであり、従って、抗体のADCC活性はFcγRIIIaに対する結合性の強さと相関するので、抗体のFcγRIIIaに対する結合性から、抗体の有するADCC活性を予測することができる。抗体のFcγRIIIaに対する結合性を測定する方法は、ELISA法 [アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] に類似の方法で測定することができる。

【0194】

具体的には、ELISAプレートに固定化したFcγRIIIaに抗体を反応させ、FcγRIIIaに結合した抗体を検出する方法や、ELISAプレートに固定化した抗原に抗体を結合させ、次いで抗原に結合した抗体に標識化したFcγRIIIaを反応、検出することにより抗体のFcγRIIIaに対する結合性を評価することができる。

FcγRIIIaは、1. 項に記載の方法によりヒト末梢血などからcDNAを取得し、適当な発現ベクターに組み込み発現させ、取得できる。FcγRIIIaを発現させる場合には、適当なタグ分子と融合させて、標識化することができる。

【0195】

また、融合蛋白質組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

4. 融合蛋白質組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた融合蛋白質分子の糖鎖構造は、通常、糖蛋白質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

融合蛋白質分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

【0196】

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置を用いる方法があげられる。BioLCはH PAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J.Liq.Chromatogr.), 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric.Biol.Chem.), 55(1), 283-284 (1991)] に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

(2) 糖鎖構造解析

融合蛋白質分子の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)] により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

【0197】

具体的には、融合蛋白質をヒドラジン分解して、融合蛋白質から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PAと略記する) による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa社製)、文献 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

【0198】

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

5. 融合蛋白質分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

融合蛋白質組成物は、融合蛋白質のFc領域に結合する糖鎖構造が異なった融合蛋白質分子から構成されている。本発明の抗体組成物は、Fc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が100%であり、高いADCC活性を示す特徴を有している。このような融合蛋白質組成物は、上記4. に記載の融合蛋白質分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

【0199】

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた融合蛋白質分子の糖鎖構造の識別は、文献 [モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第3版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウェスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA (Enzymoimmunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

【0200】

融合蛋白質組成物を構成する融合蛋白質分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である融合蛋白質組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと融合蛋白質分子の複合体の量を測定する。

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来のwheat-germ agglutinin)、ConA (C. ensiformis由来のconcanavalin A)、RIC (R. communis由来の毒素)、L-PHA (P. vulgaris由来のleukoagglutinin)、LCA (L. culinaris 由来のlentil agglutinin)、PSA (P. sativum由来のPea lectin)、AAL (Aleuria aurantia Lectin)、ACL (Amaranthus caudatus Lectin)、BPL (Bauhinia purpurea Lectin)、DSL (Datura stramonium Lectin)、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (Erythrina cristagalli Lectin)、EEL (Euonymus europaeus Lectin)、GNL (Galanthus nivalis Lectin)、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA (Helix pomatia Agglutinin)、HHL (Hippastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL (Maackia amurensis Lectin)、MPL (Maclura pomifera Lectin)、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA (Ricinus communis Agglutinin)、STL (Solanum tuberosum Lectin)、SJA (Sophora japonica Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (Ulex europaeus Agglutinin)、VVL (Vicia villosa Lectin)、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin)があげられる。

【0201】

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin)を挙げることができる。

6. 本発明の融合蛋白質組成物の利用

本発明の融合蛋白質組成物は高いADCC活性を有する。高いADCC活性を有する融合蛋白質は、腫瘍を伴う疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、微生物感染を伴う疾患をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

【0202】

腫瘍を伴う疾患としては、血液腫瘍および癌などの悪性腫瘍などがあげられる。通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高いADCC活性を有する融合蛋白質は、殺細胞効果により癌細胞を障害することにより癌を治療することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分な場合が多く化学療法との併用療法が行われているが[サイエンス (Science), 280, 1197, 1998]、本発明の融合蛋白質組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもつながる。

【0203】

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患において、それら疾患における生体内反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高いADCC活性を有する融合蛋白質を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化症、虚血性心疾患、心臓弁膜症、高血圧、脳卒中、腎不全、大動脈瘤、閉塞性動脈硬化症、原発性肺高血圧症などがあげられる。動脈硬化症は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高いADCC活性を有する抗体を用いて抑えることより、循環器疾患を予防および治療することができる。

【0204】

微生物に感染した細胞の増殖を、高いADCC活性を有する融合蛋白質を用いて抑えることにより、微生物感染をはじめとする各種疾患を予防および治療することができる。

以下に、本発明の抗体の結合性断片に使用できる腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、または微生物感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を述べる。

【0205】

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗GD2抗体 (Anticancer Res., 13, 331-336, 1993)、抗GD3抗体 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266, 1993)、抗GM2抗体 (Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994)、抗HER2抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗CD52抗体 (Nature, 332, 323-327, 1988)、抗MAGE抗体 (British J. Cancer, 83, 493-497, 2000)、抗HM1.24抗体 (Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Cancer, 88, 2909-2911, 2000)、抗FGF8抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989) 抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗FGF8受容体抗体 (J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗PMSA抗体 (J. Urology, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997) または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Oncogene, 19, 2138-2146, 2000) などがあげられる。

【0206】

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン6抗体 (Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン6受容体抗体 (Molecular Immunol., 31, 371-381, 1994)、抗インターロイキン5抗体 (Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体 (Cytokine, 3, 562-567, 1991)、抗インターロイキン4受容体抗体 (J. Immunol. Meth., 217, 41-50, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Hybridoma, 13, 183-190, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Molecular Pharmacol., 58, 237-245, 2000)、抗CCR4抗体 (Nature, 400, 776-780, 1999)、抗ケモカイン抗体 (J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994) または抗ケモカイン受容体抗体 (J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997) などがあげられる。

【0207】

循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗GpIIb/IIIa抗体 (J. Immunol., 152, 2968-2976, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体 (Science, 253, 1129-1132, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 (J. Biol. Chem., 272, 17400-17404, 1997) または抗血液凝固因子抗体 (Circulation, 101, 1158-1164, 2000) などがあげられる。

自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗自己DNA抗体 (Immunol. Letters, 72, 61-68, 2000) などがあげられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗gp120抗体 (Structure, 8, 385-395, 2000)、抗CD4抗体 (J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998)、抗CCR5抗体または抗ペロ毒素抗体 (J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999) などがあげられる。

【0208】

上記抗体は、ATCC (The American Type Culture Collection)、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS社、PharMingen社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社から入手することができる。

以下に、本発明の上記の抗体以外の結合性蛋白質と抗体Fc領域の融合抗体の具体例を述べる。

【0209】

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患に関連する結合性蛋白質と抗体Fc領域の融合蛋白質の具体例としては、sTNFRIIと抗体Fc領域との融合蛋白質であるetanercept (USP5605690)、抗原提示細胞上に発現しているLFA-3とFc領域との融合蛋白質である

alefacept(USP5914111)、Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) と抗体Fc領域との融合蛋白質 (J. Exp. Med., 181, 1869(1995))、インターロイキン-15と抗体Fc領域との融合蛋白質 (J. Immunol., 160, 5742(1998))、ファクターVIIと抗体Fc領域との融合蛋白質 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 12180(2001))、インターロイキン10と抗体Fc領域との融合蛋白質 (J. Immunol., 154, 5590(1995))、インターロイキン2と抗体Fc領域との融合蛋白質 (J. Immunol., 146, 915(1991))、CD40と抗体Fc領域との融合蛋白質 (Surgery, 132, 149(2002))、Flt-3(fms-like tyrosine kinase)と抗体Fc領域との融合蛋白質 (Acta. Haemato., 95, 218(1996)) およびOX40と抗体Fc領域との融合蛋白質 (J. Leu. Biol., 72, 522(2002)) などがあげられる。これらの他にも、各種ヒトCD分子[CD2、CD30 (TNFRSF8)、CD95 (Fas)、CD106(VCAM-1)、CD137]や接着分子[ALCAM(Activated leukocyte cell adhesion molecule)、Cadherins、ICAM (Intercellular adhesion molecule) -1、ICAM-2、ICAM-3]、サイトカイン受容体(以下、受容体をRと表記する)(IL-4R、IL-5R、IL-6R、IL-9R、IL-10R、IL-12R、IL-13R α 1、IL-13R α 2、IL-15R、IL-21R)、ケモカイン、細胞死誘導シグナル分子[B7-H1、DR6(Death receptor 6)、PD-1(Programmed death-1)、TRAIL R1、]、共刺激分子[B7-1、B7-2、B7-H2、ICOS(Inducible costimulator)]、増殖因子 (ErbB2、ErbB3、ErbB4、HGFR) あるいは分化誘導因子 (B7-H3)、活性化因子 (NKG2D)、シグナル伝達分子 (gp130) および該結合蛋白質の受容体やリガンドと抗体Fc領域との融合蛋白質は多数報告されている。

【0210】

本発明により得られる融合蛋白質組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、蛋白質製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

【0211】

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0212】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0213】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、融合蛋白質組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

【0214】

また、噴霧剤は該融合蛋白質組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該融合蛋白質組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体

等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該融合蛋白質組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。

また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0215】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ~ 20mg/kg である。

また、融合蛋白質組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

【0216】

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、文献 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373 (1993); キャンサー・リサーチ (Cancer Research), 54, 1511 (1994)] 等記載の方法に従って行うことができる。

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0217】

ゲノム上の $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ (以下、FUT8と表記する) 両対立遺伝子を破壊したCHO/DG44細胞の造成

FUT8両対立遺伝子の翻訳開始コドンを含むゲノム領域を欠失させたCHO/DG44細胞株を以下の手順で造成した。

1. チャイニーズハムスターFUT8遺伝子のエクソン2を含むターゲティングベクターpKOFUT8Neoの構築

W002/31140の実施例13の1項に記載の方法で構築されたチャイニーズハムスターFUT8遺伝子のエクソン2を含むターゲティングベクターpKOFUT8PuroおよびpK0SelectNeo (Lexicon社製)を用いて、以下のようにしてpKOFUT8Neoを構築した。

【0218】

pK0SelectNeo (Lexicon社製)を制限酵素AscI (New England Biolabs社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101社製)を用いてネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約1.6KbのAscI断片を回収した。

次に、pKOFUT8Puroを制限酵素AscI (New England Biolabs社製)で消化後、大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)により、DNA断片の末端を脱リン酸化させた。反応後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を用いて、DNA断片を精製した。

【0219】

上記で得たpK0SelectNeo由来のAscI断片 (約1.6Kb) $0.1\mu\text{g}$ とpKOFUT8Puro由来のAscI断片 (約10.1Kb) $0.1\mu\text{g}$ に滅菌水を加えて $5\mu\text{L}$ とし、Ligation High (東洋紡社製) $5\mu\text{L}$ を加えて 16°C で30分間反応させることにより、連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより各々プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377により塩基配列を解析した。このようにして図1に示したpKOFUT8Neoを得た。pKOFUT8NeoはCHO細胞のFUT8遺伝子ヘミノックアウト細胞株を作製するためのターゲティングベクターとして用いた。

2. ゲノム上のFUT8遺伝子の1コピーを破壊したヘミノックアウト細胞株の作製

(1) ターゲティングベクターpKOFUT8Neo導入株の取得

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来CHO/DG44細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555, 1986] に、実施例1の1項で

構築したチャイニーズハムスターFUT8ゲノム領域ターゲティングベクターpKOFUT8Neoを以下のようにして導入した。

【0220】

pKOFUT8Neoを制限酵素SalI (New England Biolabs社製)で消化して線状化し、線状化した4 μ gのpKOFUT8Neoを 1.6×10^6 個のCHO/DG44細胞へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入した後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) [透析FBS(インビトロジェン社製)を10%、HT supplement(インビトロジェン社製)を1倍濃度で含むIMDM培地(インビトロジェン社製)]に懸濁し、接着細胞培養用10cm Dish (Falcon社製)へ播種した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養後、G418 (ナカライテスク社製)を600 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10) [透析FBSを10%で含むIMDM培地] 10mLに培地交換した。この培地交換作業を3~4日毎に繰り返しながら5%CO₂インキュベーター内で37℃、15日間の培養を行い、G418耐性クローンを取得した。

(2) ゲノムPCRによる相同組換えの診断

本項(1)で取得したG418耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノムDNAを用いたPCRにより、以下のように行った。

【0221】

96穴プレート上のG418耐性クローンに対してトリプシン処理を行った後、2倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底96穴プレート (旭テクノグラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

レプリカプレート上のネオマイシン耐性クローンは、G418を600 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)で5%CO₂インキュベーター内で37℃、1週間培養した後、細胞を回収し、回収した細胞から公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々30 μ LのTE-RNase緩衝液(pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、200 μ g/mL RNase A] に一晩溶解した。

【0222】

ゲノムPCRに用いるプライマーは以下のように設計した。まず、W003/31140の実施例12に記載の方法により取得したFUT8ゲノム領域の配列 (配列番号13) の中から、配列番号46または配列番号47でそれぞれ示されるプライマーをフォワードプライマーとした。また、ターゲティングベクターのloxP配列に特異的に結合するプライマー (配列番号48または配列番号49) をリバースプライマーとし、以下のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いた。上記で調製したゲノムDNA溶液を各々10 μ L含む25 μ Lの反応液 [DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー (フォワードプライマーとリバースプライマーを組み合わせて使用する)] を調製し、94℃で3分間の加熱の後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとした条件でPCRを行った。

【0223】

PCR後、該反応液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、相同組換えによって生じる約1.7Kbの特異的増幅産物が認められた株を陽性クローンと判定した。

(3) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(2)で取得された陽性クローンの相同組換えの診断を、ゲノムDNAを用いたサザンプロットにより、以下のように行った。

【0224】

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、本項(2)で見出された陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5%CO₂インキュベーター内で37℃、10分間静置した後、陽性クローンに該当するウェル中の細胞を接着細胞用平底24穴プレート (グライナー社製) へ播種した。G418を600 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)を用いて5%CO₂インキュベーター内で37℃、1週間培養した後、接着細胞用平底6穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートを5%CO₂インキュベーター内で37℃にて培養し、細胞を回収した。回収した

細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150 μ LのTE-RNase緩衝液 (pH8.0) に一晚溶解した。

【0225】

上記で調製したゲノムDNA 12 μ gを制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20 μ LのTE緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA] に溶解し、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80℃で2時間の熱処理を行い、固定化した。

【0226】

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。W003/31140の実施例12に記載の方法により取得したFUT8ゲノム領域の配列 (配列番号13) の中から、配列番号50および配列番号51でそれぞれ示されるプライマーを作製し、以下のPCRに用いた。W002/31140の実施例12に記載のpFUT8fgE2-2 4.0ngをテンプレートとして含む20 μ Lの反応液 [DNAPolymerase ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー] を調製し、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、74℃で1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件でPCRを行った。

【0227】

PCR後、該反応液を1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101社製) を用いて約230bpのプローブDNA断片を回収した。得られたプローブDNA溶液のうち5 μ Lを、[α -³²P] dCTP 1.75MBqおよび Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下に行った。まず、上記のゲノムDNA消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mLのハイブリダイゼーション液 [5 \times SSPE、50 \times Denhardt's液、0.5% (w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子DNA] を加えて65℃で3時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P標識したプローブDNAを熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

【0228】

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を50mLの一次洗浄液 [2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を2回繰り返した後、ナイロン膜を50mLの二次洗浄液 [0.2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

図2には、親株であるCHO/DG44細胞、および本項(2)で取得した陽性クローンである50-10-104株のゲノムDNAを本法により解析した結果を示した。CHO/DG44細胞では、野生型FUT8対立遺伝子由来の約25.5Kbの断片のみが検出された。一方、陽性クローン50-10-104株では、野生型FUT8対立遺伝子由来の約25.5Kbの断片に加え、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約20.0Kbの断片が検出された。両断片の量比は1:1であったことから、50-10-104株は、FUT8対立遺伝子のうち1コピーが破壊されたヘミノックアウトクローンであることが確認された。

3. ゲノム上のFUT8遺伝子をダブルノックアウトしたCHO/DG44細胞の作製

(1) ターゲティングベクターpKOFUT8Puro導入株の作製

本実施例の2項で得たFUT8遺伝子ヘミノックアウトクローンのもう一方のFUT8対立遺伝子を破壊するために、W002/31140の実施例13の1項に記載のチャイニーズハムスターFUT8遺伝子エクソン2ターゲティングベクターであるpKOFUT8Puroを以下のようにして導入した。

【0229】

pKOFUT8Puroを制限酵素SalI (New England Biolabs社製) で消化して線状化し、線状化した4 μ gのpKOFUT8Puroを 1.6×10^6 個のFUT8遺伝子ヘミノックアウトクローンへエレクト

ロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) に懸濁し、接着細胞培養用10cmデッシュ (Falcon社製) へ播種した。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、24時間培養後、ピューロマイシン (SIGMA社製) を15 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mLに培地交換した。この培地交換作業を7日毎に繰り返しながら5%CO₂ インキュベーター内で37℃、15日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性クローンを取得した。

(2) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(1)で取得された薬剤耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノムDNAを用いたサザンプロットにより以下のように行った。

【0230】

ピューロマイシン耐性クローンを、公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノグラス社製) へ採取し、ピューロマイシン (SIGMA社製) を15 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて5%CO₂ インキュベーター内で37℃、1週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、接着細胞用平底24穴プレート (グライナー社製) へ播種した。ピューロマイシン (SIGMA社製) を15 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて5%CO₂ インキュベーター内で37℃、1週間培養した後、同様にトリプシン処理を行い、接着細胞用平底6穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートを5%CO₂ インキュベーター内で37℃にて培養し、回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150 μ LのTE-RNase緩衝液 (pH8.0) に一晩溶解した。

【0231】

上記で調製したゲノムDNA 12 μ gを制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20 μ LのTE緩衝液 (pH8.0) に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. US A), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写後、ナイロン膜に対し80℃で2時間の熱処理を行い、固定化した。

【0232】

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、ターゲティングベクターに含まれるFUT8ゲノム領域よりもさらに5'側の配列に特異的に結合するプライマー (配列番号52および配列番号53) を作製し、以下のPCRに用いた。W002/31140の実施例12に記載のプラスミドpFUT8fgE2-2 4.0ngをテンプレートとして含む20 μ Lの反応液 [DNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー] を調製し、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、74℃で1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件でPCRを行った。

【0233】

PCR後、該反応液を1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BI0101社製) を用いて約230bpのプローブDNA断片を精製した。得られたプローブDNA溶液のうち5 μ Lを、[α -³²P] dCTP 1.75MBqおよび Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のゲノムDNA消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mLのハイブリダイゼーション液 [5 \times SSP E、50 \times Denhardt's液、0.5%(w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子DNA] を加えて65℃で3時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P標識したプローブDNAを熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

【0234】

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を50mLの一次洗浄液 [2 \times SSC-0.1%(w/v) SDS] に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を2回繰り返した後、ナイ

ロン膜を50mLの二次洗浄液 [0.2×SSC-0.1%(w/v) SDS] に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

図3には、50-10-104株から本項(1)に記載の方法により取得したピューロマイシン耐性クローンの1つであるWK704株のゲノムDNAを本法により解析した結果を示した。WK704株では、野生型FUT8対立遺伝子由来の約25.5Kbの断片が消失し、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約20.0Kbの断片(図中に矢印で示す)のみが検出された。この結果からWK704株は、FUT8両対立遺伝子が破壊されたクローンであることが確認された。

4. FUT8遺伝子をダブルノックアウトした細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Creリコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例の3項で取得したFUT8遺伝子ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子を除去することを目的として、Creリコンビナーゼ発現ベクターpBS185 (Life Technologies社製)を以下のようにして導入した。

【0235】

4μgのpBS185を 1.6×10^6 個のFUT8遺伝子ダブルノックアウトクローンへエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mLに懸濁し、さらに同培地を用いて2万倍に希釈した。該希釈液を接着細胞培養用10cm ディッシュ (Falcon社製) 7枚へ播種後、5%CO₂ インキュベーター内で37℃、10日間の培養を行い、コロニーを形成させた。

・ Creリコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項(1)で取得したコロニーのうち、任意のクローンを公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノガラス社製) へ採取し、IMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて5%CO₂ インキュベーター内で37℃、1週間培養した。

【0236】

培養後、上記プレートの各クローンに対してトリプシン処理を行い、2倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底96穴プレート (旭テクノガラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

次にレプリカプレート上の細胞を、G418を600μg/mL、ピューロマイシンを15μg/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて5%CO₂ インキュベーター内で37℃、一週間培養した。Creリコンビナーゼの発現によりloxP配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、G418およびピューロマイシン存在下で死滅する。本法により陽性クローンを選択した。

(3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項(2)で選択した陽性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

【0237】

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、上記陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5%CO₂ インキュベーター内で37℃、10分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底24穴プレート (グライナー社製) へ播種した。IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて1週間培養した後、トリプシン処理を行い、接着細胞用平底6穴プレート (グライナー社製) へ播種して5%CO₂ インキュベーター内で37℃で培養し、増殖した細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150μLのTE-RNase緩衝液(pH8.0)に一晩溶解した。

【0238】

上記で調製したゲノムDNA 12μgを制限酵素NheI (New England Biolabs社製)で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20μLのTE緩衝液(pH8.0)に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)]

, 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80℃で2時間の熱処理を行い、固定化した。

【0239】

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。ターゲティングベクターに含まれるFUT8ゲノム領域よりもさらに5'側の配列に特異的に結合するプライマー(配列番号52および配列番号53)を用いて、以下のPCRを行った。W002/31140の実施例12に記載のpFUT8fgE2-2 4.0ngをテンプレートとして含む20μLの反応液[DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)、ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5μmol/L 上記プライマー]を調製し、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、74℃で1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件でPCRを行った。

【0240】

PCR後、該反応液を1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101社製)を用いて、約230bpのプローブDNA断片を精製した。得られたプローブDNA溶液のうち5μLを、[α-³²P] dCTP 1.75MBqおよび Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下に行った。まず、上記のゲノムDNA消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhardt's液、0.5%(w/v) SDS、100μg/mL サケ精子DNA] 15mLを加えて65℃で3時間のプレハイブリダイゼーション後、³²P標識したプローブDNAを熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

【0241】

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を50mLの一次洗浄液 [2×SSC-0.1%(W/V) SDS] に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を2回繰り返した後、ナイロン膜を50mLの二次洗浄液 [0.2×SSC-0.1%(W/V) SDS] に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

図4には、親株であるCHO/DG44細胞、本実施例の2項に記載の50-10-104株、本実施例の3項に記載のWK704株、およびWK704株から本項(2)に記載の方法により取得した薬剤感受性クローンの1つである4-5-C3株のゲノムDNAを、本法により解析した結果を示した。CHO/DG44細胞では、野生型FUT8対立遺伝子に由来する約8.0KbのDNA断片のみが検出された。また、50-10-104株やWK704株では、相同組換えが起こった対立遺伝子に由来する約9.5KbのDNA断片が認められた。一方、4-5-C3株では、相同組換えが起こった対立遺伝子からさらにネオマイシン耐性遺伝子(約1.6Kb) およびピューロマイシン耐性遺伝子(約1.5Kb) が除去されて生じる約8.0KbのDNA断片のみが検出された。この結果から4-5-C3株は、Creリコンビナーゼにより薬剤耐性遺伝子が除去されたことが確認された。

【0242】

薬剤耐性遺伝子の除去されたFUT8遺伝子ダブルノックアウトクローン(以下、FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞と表記する)は、4-5-C3株以外にも複数株取得された。

【実施例2】

【0243】

FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞による抗TAG-72 scFv-Fcの発現

1. 抗TAG-72 scFv-Fc発現ベクターの作製

(1) 抗TAG-72マウスモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの構築

癌細胞表面抗原TAG-72を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体CC49 (The Journal of Immunology, 1993, 151, 6559, Genbank Accession number/L14549) のVHをコードするDNAを以下の様に構築した。

【0244】

まず、配列番号18に示される塩基配列を設計した。該配列は、CC49のVHをコードする配列を、クローニングベクターおよび発現ベクターにクローニングするための制限酵素認識配列、コード領域の5'側にはscFv-Fcの生産量を向上させるために11塩基の非翻訳配列および3'側にはリンカーをコードする塩基配列を組み入れた。設計した配列はセンス鎖とア

ンチセンス鎖が交互になるように、5' 端側から約130塩基ずつ計4本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約20塩基が重複し、対合できるようにした。実際には、配列番号19、20、21および22でそれぞれ示される4本の合成DNA（ファスマック社製）を作製した。

【0245】

4本の合成DNAのうち両端に位置する2本については終濃度が $0.5\mu\text{M}$ 、中間の2本については終濃度が $0.1\mu\text{M}$ となるように、PCR反応液[2.5units KOD DNA Polymerase（東洋紡績社製）、1倍濃度のKOD DNA Polymeraseに添付PCR Buffer #2（東洋紡績社製）、0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウム]を調製し、DNAサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems社製）を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて60秒間からなる反応を1サイクルとして、25サイクル行なった後、74℃にて5分間反応させた。PCR後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて、約450bpのPCR産物を回収した。回収したPCR産物を制限酵素SpeI（宝酒造社製）および制限酵素EcoRI（宝酒造社製）で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて、約450bpのVHのPCR産物を回収した。

【0246】

一方、プラスミドpBluescriptII SK(-)（Stratagene社製）を制限酵素EcoRI（宝酒造社製）およびSpeI（宝酒造社製）で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約2.9kbpの断片を回収した。

上記で得たPCR産物由来の断片とプラスミドpBluescriptII SK (-)由来の断片を、Ligation High溶液（東洋紡績社製）により連結反応を行い、該反応を用いて大腸菌XL1-BLUE MRF' 株（Stratagene社製）を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0（Applied Biosystems社製）を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377により各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列を解析し、図5に示したプラスミドpBSIISK(-)/CC49VHが得られたことを確認した。

(2) 抗TAG-72マウスモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの構築

癌細胞表面抗原TAG-72を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体CC49（The Journal of Immunology, 1993, 151, 6559、Genbank Accession number/L14553）の軽鎖可変領域（以下VLと表記する）をコードするDNAを以下の様にして構築した。

【0247】

まず、配列番号23に示される塩基配列を設計した。該配列には、CC49のVLをコードする配列を、クローニングベクターおよび発現ベクターにクローニングするための制限酵素認識配列、コード領域の3' 側にヒンジ領域の塩基配列およびヒトIgG1のCH2領域の塩基配列、5' 側にはVHとのリンカーをコードする塩基配列を組み入れた。設計した配列はセンス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように、5' 端側から約150塩基ずつ計4本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約20塩基が重複し、対合できるように設計した。実際には、配列番号24、25、26および27でそれぞれ示される4本の合成DNA（ファスマック社製）を作製した。

【0248】

4本の合成DNAのうち両端に位置する2本については終濃度が $0.5\mu\text{M}$ 、中間の2本については終濃度が $0.1\mu\text{M}$ となるように、PCR反応液[2.5units KOD DNA Polymerase（東洋紡績社製）、KOD DNA Polymerase添付PCR Buffer #2（東洋紡績社製）、0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウム]を調製し、DNAサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems社製）を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて60秒間からなる反応を1サイクルとして、25サイクル行なった後、74℃にて5分間反応させた。PCR後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて、約540bpのVLのPCR産物を回収した。回収したPCR産物を制限酵素SpeI（宝酒造社製）および制限酵素EcoRI（宝酒造社製）で消化後、該反応液

をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約450bpのVLのPCR産物由来の断片を回収した。

【0249】

一方、プラスミドpBluescriptII SK(-) (Stratagene社製) を制限酵素EcoRI (宝酒造社製) およびSpeI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約2.9kbpの断片を回収した。

上記で得た約450bpのVLのPCR由来の断片とプラスミドpBluescriptII SK (-)由来の断片を、Ligation High溶液 (東洋紡績社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377により各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列を解析し、図6に示したプラスミドpBSIISK(-)/CC49VLが得られたことを確認した。

(3) 抗TAG-72 scFv-Fc発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93 [Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)]、本項(1)および(2)で得られたプラスミドpBSIISK(-)/CC49VHおよびpBSIISK(-)/CC49VLから、抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の発現ベクターを以下の様にして構築した。

【0250】

本項(1)で得られたプラスミドpBSIISK(-)/CC49VHを制限酵素AccIII (宝酒造社製) および制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約450bpのEcoRI-AccIII断片を回収した。

また、本項(2)で得られたプラスミドpBSIISK(-)/CC49VLを制限酵素AccIII (宝酒造社製) および制限酵素BmgBI (New England Biolabs社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約540bpのAccIII-BmgBI断片を回収した。

【0251】

一方、ヒト化抗体発現用ベクタープラスミドpKANTEX93を制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素BmgBI (New England Biolabs社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約9.8kbpのEcoRI-BmgBI断片を回収した。

上記で得たプラスミドpBSIISK(-)/CC49VH由来のEcoRI-AccIII断片、プラスミドpBSIISK(-)/CC49VL由来のAccIII-BmgBI断片およびプラスミドpKANTEX93由来の断片を、Ligation High溶液 (東洋紡績社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377により各プラスミドに挿入された塩基配列を解析し、図7に示したプラスミドpKANTEX93/CC49scFv-Fcが得られたことを確認した。

2. FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例1の4項に記載のFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株であるCHO/DG44細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の1項で作製した抗TAG-72 scFv-Fc発現ベクターpKANTEX93/CC49scFv-Fcを導入して、抗体Fcに付加する糖鎖の構造が異なる二種類の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の安定生産細胞を以下の様にして作製した。

【0252】

8 μ gのプラスミドpKANTEX93/CC49scFv-Fcを1.6 $\times 10^6$ 細胞のMs705細胞あるいはCHO/DG44細胞へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、30mLのIMDM-(10) [Ms705細胞の場合には牛胎児血清(FCS)を、CHO/DG44細胞の場合には透析牛血清(dFBS)を10%で含むIMDM培地: GIBCO-BRL社製]培地に懸濁し、96ウェルマイクロプレート (住友ベークライト社製) に100 μ L/ウェルずつ分注した。5%

CO₂ インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、600 μ g/mL の濃度でG418を含むIMDM-(10) 培地において1~2週間培養した。各ウェルから培養上清を回収し、培養上清中の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の産生量を本実施例の3項に示すELISA法により測定した。

【0253】

培養上清中にscFv-Fcの発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418を600 μ g/mL、dhfr遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTXと表記する：SIGMA社製）を50nMの濃度で含むIMDM-(10)培地に懸濁し、5%CO₂ インキュベーター内で37℃、約1週間培養し、50nMのMTXに耐性を示す形質転換株を取得した。次に、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的に600 μ g/mLのG418および200nMのMTXを含むIMDM-(10)培地で増殖可能な形質転換株を取得した。取得した形質転換株について、限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。

【0254】

最終的にG418を500 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質を生産する形質転換株を取得した。親株のCHO/DG44細胞より得られた形質転換株をKC1201と、FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株をKC1200と名付けた。

3. 培養上清中の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質抗体濃度の測定（ELISA法）

ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体(American Qualex社製)をPhosphate Buffered Saline（以下、PBSと表記する）で希釈して1 μ g/mLとし、96穴のELISA用プレート（グライナー社製）に、50 μ L/ウェルで分注し、室温で一時間静置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%牛血清アルブミン（以下、BSAと表記する；Proliant Inc.社製）を含むPBS（以下、1%BSA-PBSと表記する）を100 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを除去し、測定対象の培養上清を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS（以下、Tween-PBSと表記する）で洗浄後、PBSで500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc)抗体溶液（American Qualex社製）を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ L/mLで添加した溶液]を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度（以下、OD415と表記する）を測定した。

4. 抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の精製

本実施例の2項で得られた抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質を発現する形質転換細胞株KC1200およびKC1201をそれぞれ200nM MTXを含むIMDM-FCS(10)に1 \times 10⁵細胞/mLとなる様に懸濁し、182cm² フラスコ（Greiner社製）に50mL分注した。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を除去し、25mLのPBSで洗浄後、EXCELL301培地（JRH Biosciences社製）30mLを注入した。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、7日間培養した後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4℃の条件で5分間の遠心分離を行って上清をそれぞれ回収した後、0.22 μ m孔径PES Membrane（イワキ社製）を用いて濾過滅菌した。上述の方法で回収した培養上清よりProsep-A（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、異なる形質転換細胞株で生産される二種類の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質をそれぞれ精製した。以後、精製した抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質は、それぞれKC1200により生産される抗TAG-72 scFv-Fc(-)およびKC1201により生産される抗TAG-72 scFv-Fc(+)と表記する。

5. 精製抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の分析

本実施例の4項で精製した抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の精製度および抗体に付加している全N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を以下の様にして確認した。

(1) 抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の精製度の評価

各精製抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の約3 μ gを、公知の方法[ネイチャー(Nature), 227

、680 (1970)]に従ってSDS変性ポリアクリルアミド電気泳動（以下、SDS-PAGEと表記する）を行った。結果を図8に示した。二種類の精製蛋白質はそれぞれ、非還元条件下は約110キロダルトン（以下、kDaと表記する）、還元条件下では約55kDaのバンドとして検出された。この結果は、scFv-Fc融合蛋白質の分子量が、非還元条件下では約110kDaであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合（以下、S-S結合と表記する）が切断され、約55kDaの構成単位に分解されるという報告（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 36, 61-71）と一致し、宿主の異なる抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)では泳動パターンが類似している。このことから、抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)は目的に合致したポリペプチド鎖として発現されていることが示唆された。

(2) 精製抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の単糖組成分析

本実施例の4項で得られた抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の精製標品を遠心濃縮機で減圧下乾固した後、2.0-4.0Mのトリフルオロ酢酸溶液を加えて100℃、2-4時間酸加水分解を行い、タンパク質から中性糖・アミノ糖を遊離した。トリフルオロ酢酸溶液を遠心濃縮機で除去し、脱イオン水に再溶解してDionex社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析を行った。CarboPac PA-1カラム、CarboPac PA-1ガードカラム(Dionex社製)を用い、溶離液として10-20mM水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液、洗浄液として500mM水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液を使用して、表1に示した溶出プログラムで分析した。

【0255】

【表1】

中性糖・アミノ糖組成分析の溶出プログラム

時間 (分)	0	35	35.1	45	45.1	58
溶離液 (%)	100	100	0	0	100	100
洗浄液 (%)	0	0	100	100	0	0

【0256】

得られた溶出プロファイルの中性糖・アミノ糖成分のピーク面積から、N-アセチルグルコサミン比を4とした場合の各成分（フコース、ガラクトース、マンノース）の組成比を算出した。

表2に各蛋白質の単糖組成比により計算される、全N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を示した。抗TAG-72 scFv-Fc(+)ではフコースが結合していない糖鎖の割合が9%であった。一方、抗TAG-72 scFv-Fc(-)ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ100%と見積もられた。

【0257】

以上の結果より、抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質のN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

(表2)

蛋白質名	抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質のフコース非含有糖鎖の割合 フコースを含まない糖鎖率 (%)
抗TAG-72 scFv-Fc(+)	9%
抗TAG-72 scFv-Fc(-)	~100%

【実施例 3】

【0258】

抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の活性評価

1. 抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質のTAG-72発現細胞に対する結合活性（蛍光抗体法）

実施例2の4項で得られた抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の精製標品の結合活性を、フローサイトメーターEPICS-XL (Coulter社製)を用いた蛍光抗体法によって評価した。陰性対照として抗IL-5受容体ヒト化抗体KM8404 (The Journal of Biological Chemistry, 2003, 31, 3466-3473)を用いた。

【0259】

TAG-72陽性細胞であるヒトT細胞リンパ腫由来細胞株Jurkat細胞(RCB 0806)を1ウェル当たり 2×10^5 個になるように96ウェルU字プレート(Falcon社製)に分注し、抗TAG-72 scFv-Fc(-)、抗TAG-72 scFv-Fc(+)あるいはKM8404をFACS用緩衝液(0.02% EDTA、0.05% NaN_3 および0.5% BSAを含むPBS)で終濃度が $0.016 \sim 50 \mu\text{g/mL}$ となるように希釈した抗体溶液を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加して、氷中で30分間反応させた。FACS用緩衝液で2回洗浄した後、FITC標識抗ヒトIgG1抗体(Zymed社製)をFACS用緩衝液で20倍希釈したものを $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加した。遮光し氷中で30分間反応させた後、FACS用緩衝液で3回洗浄し、 $500 \mu\text{L}$ のPBSに懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。

【0260】

結果を図9に示した。抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)については濃度依存的に蛍光強度が増加しており、各濃度でのJurkat細胞への結合活性は同等であったが、陰性対照であるKM8404についてはJurkat細胞とは反応しなかった。以上のことから、抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)のTAG-72陽性細胞であるJurkat細胞への結合は、融合蛋白質のscFv部分に特異的な結合であり、この結合は抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質に付加する糖鎖中のフコース含量とは無関係であることが示された。

2. 抗TAG-72 scFv-FcのTAG-72結合活性 (ELISA法)

ヒト体液由来のTAG-72 (シグマ社製)をPBSで $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈し、96穴のELISA用プレート(グラインナー社製)に、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注して室温で一時間静置して吸着させた。PBSで洗浄後、1% BSA-PBSを $100 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1% BSA-PBSを除去し、 $0.0032 \mu\text{g/mL} \sim 50 \mu\text{g/mL}$ の濃度で抗TAG-72 scFv-Fc(-)、抗TAG-72 scFv-Fc(+)または陰性対照である抗IL-5受容体ヒト化抗体KM8404を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、PBSで500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc)抗体溶液(American Qualex社製)を二次抗体溶液として、それぞれ $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

【0261】

結果を図10に示した。抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)は濃度依存的に抗原であるTAG-72に結合することが確認され、その結合はほぼ同等であった。一方、陰性対象のKM8404では、TAG-72に対する結合は認められなかった。以上のことから、作製した糖鎖構造の異なる二種類の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の抗原であるTAG-72への結合は、scFvに特異的な結合であった。二種類の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の抗原への結合活性はほぼ同等であったが、抗TAG-72 scFv-Fc(-)の抗原であるTAG-72に対する結合活性は、抗TAG-72 scFv-Fc(+)のTAG-72に対する結合活性と比較して、若干であるが高いことが確認された。

3. 抗TAG-72 scFv-FcのFc γ 受容体IIIa結合活性 (ELISA法)

Fc γ 受容体IIIaには、N末端のメチオニンから数えて176番目のアミノ酸残基の遺伝子多形によりバリニン型(以下、Fc γ RIIIa(V)と表記する)およびフェニルアラニン型(以下、Fc γ RIIIa(F)と表記する)の二種が存在し、両者は抗体Fcに対する結合活性が異なることが知られている。Fc γ RIIIa(V)およびFc γ RIIIa(F)に対する抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の結合活性を測定した。測定に使用したヒスチジントグ標識Fc γ RIIIa(V)およびヒスチジントグ標識Fc γ RIIIa(F)は、後述する参考例に作製法を示した。

【0262】

まず、マウス抗ヒスチジntag抗体 (QIAGEN社製) を吸着させたプレートに、PBSで1 μ g/mLに希釈したヒスチジntag標識Fc γ RIIIa(V)またはヒスチジntag標識Fc γ RIIIa(F)を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、0.0017 μ g/mL~100 μ g/mLの濃度で抗TAG-72 scFv-Fc(-)あるいは抗TAG-72 scFv-Fc(+)を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、PBSで6000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIg(H&L)抗体溶液 (American Qualex社製) を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

【0263】

結果を図11に示した。抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)は濃度依存的にFc γ RIIIaに結合することが確認でき、Fc γ RIIIaに対する抗TAG-72 scFv-Fc(-)の結合活性は、抗TAG-72 scFv-Fc(+)の結合活性と比較して有意に高いことが示された。この結果は、二種類のFc γ RIIIaの多形で同様であった。また、scFv-Fc(-)およびscFv-Fc(+)とFc γ RIIIaとの間に結合が確認されたことより、scFv-FcのFc領域は、Fc γ RIIIaと結合活性を保持した形で発現していることが示された。

4. 抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の抗原であるTAG-72存在下でのFc γ 受容体RIIIa結合活性 (ELISA法)

抗原であるTAG-72の存在下で抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質のFc γ RIIIa(V)およびFc γ RIIIa(F)との結合活性を測定した。測定に使用したヒスチジntag標識Fc γ RIIIa(V)およびヒスチジntag標識Fc γ RIIIa(F)は、後述する参考例に作製法を示した。

【0264】

まず、本実施例の2項で作製したプレートに、0.0017 μ g/mL~100 μ g/mLの濃度で抗TAG-72 scFv-Fc(-)または抗TAG-72 scFv-Fc(+)を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、PBSで1 μ g/mLに希釈したヒスチジntag標識Fc γ RIIIa(V)またはヒスチジntag標識Fc γ RIIIa(F)を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、PBSで1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒスチジntag抗体溶液 (QIAGEN社製) を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

【0265】

結果を図12に示した。抗TAG-72 scFv-Fc(-)は濃度依存的にFc γ RIIIaおよび抗原であるTAG-72に対して結合活性が認められたが、抗TAG-72 scFv-Fc(+)では発色が認められなかった。これは、本実施例の2項で確認された、TAG-72に対する結合活性の抗TAG-72 scFv-Fc(-)と抗TAG-72 scFv-Fc(+)間の差以上に、Fc γ RIII

aに対する結合活性が低下していることが原因と思われた。また、Fc γ RIIIaではその多形とは関係なしに、抗原であるTAG-72の存在下でのFc γ RIIIaに対する抗TAG-72 scFv-Fc(-)の結合活性は、Fc γ RIIIaに対する抗TAG-72 scFv-Fc(+)の結合活性よりも高いことが確認され、バリン型のFc γ RIIIa (V) においてはTAG-72 scFv-Fc(-)と抗TAG-72 scFv-Fc(+)のFc γ RIIIaに対する結合活性の差が顕著であった。

5. TAG-72発現細胞株に対する細胞傷害活性の評価 (ADCC活性、⁵¹Cr解離法)

上記実施例2の4項で得られた精製抗TAG-72 scFv-Fc(-)および上記実施例2の1項で得られた精製抗TAG-72 scFv-Fc(+)の*invitro*細胞傷害活性を評価するため、TAG-72陽性であるヒトT細胞リンパ腫由来細胞株Jurkat細胞に対するADCC活性を、健常人ドナーAから採取したエフエクター細胞を用いて、以下のようにして測定した。また、陰性対照の細胞株として、TAG-72が発現していない細胞株であるRaji細胞 (RCB 0806) を用いて⁵¹Cr解離法によるADCC活性を測定した。

(1) 標的細胞懸濁液の調製

Jurkat細胞あるいはRaji細胞を2 \times 10⁶細胞/mLの濃度になるようにRPMI1640-FCS(10)培

地 [FCSを10%含むRPMI1640培地(GIBCO BRL社製)] に懸濁し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37℃で1時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FCS(10)培地を用いて懸濁及び遠心分離操作を繰り返すことにより3回洗浄し、再度RPMI1640-FCS(10)培地に懸濁し、4℃で30分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。洗浄後、培地を10mL加えて 2×10^5 細胞/mLに調整し、標的細胞懸濁液とした。

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健康人末梢血50mLを採取し、ヘパリンナトリウム(武田薬品社製)0.2mLを加え穏やかに混合した。これをLymphoprep(第一化学薬品社製)を用いて使用説明書に従い、単核球層を分離した。RPMI1640培地で1回、RPMI1640-FCS(10)培地で1回遠心分離して洗浄後、RPMI1640-FCS(10)培地を加えて 2×10^6 細胞/mLに調整し、ヒトエフェクター細胞懸濁液とした。

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート(Falcon社製)の各ウェルに(1)で調製した標的細胞溶液の50 μL (1×10^4 細胞/ウェル)を分注した。次いで(2)で調製したヒトエフェクター細胞溶液を100 μL (2×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は20:1となる)添加した。更に、抗TAG-72 scFv-Fc(-)または抗TAG-72 scFv-Fc(+)を各最終濃度0.000094~50 $\mu\text{g/mL}$ となるように加えて全量を200 μL とし、37℃で4時間反応させた。反応後、遠心分離により該反応溶液を細胞群と上清とに分離し、上清中の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。scFv-Fc濃度0における解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。自然解離 ^{51}Cr 量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに1Nの塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性は次式により求めた。結果を図13に示した。

【0266】

【数1】

$$\text{細胞障害活性(\%)} = \frac{[\text{検体の吸光度}] - [\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]}{[\text{標的細胞全遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]} \times 100$$

【0267】

抗TAG-72 scFv-Fc(-)または抗TAG-72 scFv-Fc(+)において、TAG-72陽性細胞であるJurkat細胞に対して濃度依存的なADCC活性が認められた(図13A)。いずれの抗体濃度においても、抗TAG-72 scFv-Fc(-)によるADCC活性は抗TAG-72 scFv-Fc(+)によるADCC活性よりも高く、また、最大細胞傷害活性も抗TAG-72 scFv-Fc(+)と比べて抗TAG-72 scFv-Fc(-)の方が高く、抗TAG-72 scFv-Fc(+)が抗TAG-72 scFv-Fc(-)と同等のADCC活性を示すためには、1000倍の濃度が必要であり、本実施例の2項で確認された抗TAG-72 scFv-Fc(+)および抗TAG-72 scFv-Fc(-)の抗原であるTAG-72に対する結合活性の差以上の違いであった。また、TAG-72陰性であるRaji細胞に対しては、scFv-Fc(-)およびscFv-Fc(+)はともにADCC活性は認められなかった(図13B)。

【0268】

以上のことから、抗TAG-72 scFv-Fc(-)と抗TAG-72 scFv-Fc(+)の間には、全N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合に差が認められており、この糖鎖の割合の差が、抗TAG-72 scFv-Fc(-)と抗TAG-72 scFv-Fc(+)の間のFc γ RIIIaに対する結合活性の差となり、さらにこのFc γ RIIIaに対する結合活性の差が、ADCC活性の差となっていることが確認できた。

【実施例4】

【0269】

可溶性TNF- α 受容体II-Fc融合蛋白質 (sTNFRII-Fc) の作製

1. sTNFRII-Fc発現ベクターの作製

(1) sTNFRIIをコードするDNAの構築

USP5605690に記載のsTNFRII-Fc融合蛋白質をコードするcDNAをPCR法により以下のように構築した。なお、該cDNAの全長が長いために、sTNFRIIをコードするcDNA配列中に存在する制限酵素B_{ln}I部位で分割し、その前半(配列番号28)と後半(配列番号29)の2種類のcDNA配列をそれぞれ作製した。

【0270】

まず、配列番号28に記載の配列には、sTNFRIIをコードする配列の前半部分の5'末端に87塩基の非翻訳領域とsTNFRIIの分泌シグナル配列を組み入れた。更に配列の5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列(クローニングベクターおよび発現ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約150塩基ずつ計4本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号30、31、32および33の4本の合成オリゴヌクレオチドを合成した(ファスマック社製)。

【0271】

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに0.4 μ M M13 primer RV(宝酒造社製)、0.4 μ M M13 primer M3(配列番号43、GENSET社製)および2.5単位のKOD polymerase(東洋紡績社製)を用いて、合計50 μ Lとし、PCR反応を行った。反応条件は94℃30秒間、55℃30秒間、74℃60秒間のサイクルを25サイクル、その後74℃5分間を1サイクルで行った。該反応液をQIA quick PCR purification kit(QIAGEN社製)にて精製し、制限酵素KpnI(New England Biolabs社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、約0.49kbのKpnI-HindIII断片を回収した。

【0272】

一方、プラスミドpBluescript II SK(-)(Stratagene社製)を制限酵素KpnI(New England Biolabs社製)および制限酵素HindIII(New England Biolabs社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、約2.9kbのKpnI-HindIII断片を回収した。

次に、上記で得られたsTNFRII前半部分のPCR産物のKpnI-HindIII断片とプラスミドpBluescript II SK(-)のKpnI-HindIII断片を、Ligation High溶液(東洋紡績社製)を用いて添付の説明書に従って連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌DH5a株(東洋紡績社製)を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3(Applied Biosystems社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM377により各プラスミドに挿入されたPCR断片の塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する図14に示したプラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-1が得られたことを確認した。

【0273】

次に、配列番号29に記載の配列には、sTNFRIIをコードする配列の後半部分とその3'末端にヒトFcのヒンジとCH2領域の一部を組み入れた。更に配列の5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列(クローニングベクターおよび発現ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約150塩基ずつ計4本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号34、35、36および37の4本の合成オリゴヌクレオチドを合成した(ファスマック社製)。

【0274】

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに0.4 μ M M13 primer RV(宝酒造社製)、0.4 μ M M13 primer

M3 (GENSET社製) および2.5単位のKOD polymerase (東洋紡績社製) を用いて、合計50 μ Lとし、PCR反応を行った。反応条件は94℃30秒間、55℃30秒間、74℃60秒間のサイクルを25サイクル、その後74℃5分間を1サイクルで行った。該反応液をQIA quick PCR purification kit (QIAGEN社製) にて精製し、制限酵素KpnI (New England Biolabs社製) および制限酵素HindIII (New England Biolabs社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約0.5kbのKpnI-HindIII断片を回収した。

【0275】

次に、上記で得られたsTNFRII後半部分のPCR産物のKpnI-HindIII断片と上記で得られたプラスミドpBluescript II SK(-)のKpnI-HindIII断片を、Ligation High溶液 (東洋紡績社製) により連結し、該反応液を用いて大腸菌DH5a株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM377により各プラスミドに挿入されたPCR断片の塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する図15に示したプラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-2が得られたことを確認した。

(2) sTNFRII-FcをコードするDNAの構築

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93を制限酵素ApaI (宝酒造社製) および制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約1.0kbpのヒトIgG1サブクラスH鎖定常領域 (hC γ 1) を含む断片ApaI-BamHIを回収した。同様に、プラスミドpBluescript II SK (-) (STRATAGENE社製) も制限酵素ApaI (宝酒造社製) および制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) で消化後、約2.9kbpのApaI-BamHI断片を回収した。pKANTEX93由来の約1.0kbpのApaI-BamHI断片、およびpBluescript II SK(-)由来の約2.9kbpのApaI-BamHI断片をTAKARA DNA Ligation Kit Ver.2のsolution I (宝酒造社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換してプラスミドpBsIISK(-)/hC γ 1を構築した。

【0276】

本項(1)で得られたプラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-1を制限酵素KpnI (New England Biolabs社製) および制限酵素BlnI (New England Biolabs社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約0.48kbのKpnI-BlnI断片を回収した。

また、本項(1)で得られたプラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-2を制限酵素BlnI (New England Biolabs社製) および制限酵素StyI (New England Biolabs社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約0.49kbのBlnI-StyI断片を回収した。

【0277】

一方、プラスミドpBsIISK(-)/hC γ 1を制限酵素KpnI (New England Biolabs社製) および制限酵素StyI (New England Biolabs社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約3.5kbpのKpnI-StyI断片を回収した。

上記で得られたプラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-1由来のKpnI-BlnI断片、プラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-2由来のBlnI-StyI断片およびプラスミドpBsIISK(-)/hC γ 1由来のStyI-KpnI断片をLigation High溶液 (東洋紡績社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌DH5a株 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377により各プラスミドに挿入された断片の塩基配列を解析し、図16に示したプラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-Fcが得られたことを確認した。

(3) sTNFRII-Fc融合蛋白質発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と本項(2)で得られたプラスミドpBsIISK(-)/sTNFR_{II}-Fcを用いてsTNFR_{II}-Fc融合蛋白質発現ベクターpKANTEX93/sTNFR_{II}-Fcを以下の様にして構築した。

【0278】

本項(2)で得られたプラスミドpBsIISK(-)/sTNFR_{II}-Fcを制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素BamHI(New England Biolabs社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画した。QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、約1.6 kbpのEcoRI-BamHI断片を回収した。

一方、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93を制限酵素EcoRI(宝酒造社製)とBamHI(New England Biolabs社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画した。QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、約9.3 kbpのEcoRI-BamHI断片を回収した。

【0279】

次に、上記で得られたpBsIISK(-)/sTNFR_{II}-Fc由来EcoRI-BamHI断片とプラスミドpKANTEX93由来のEcoRI-BamHI断片をLigation High溶液(東洋紡績社製)により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌DH5a株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3(Applied Biosystems社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377により各プラスミドに挿入された断片の塩基配列を解析し、図17に示したプラスミドpKANTEX93/sTNFR_{II}-Fcが得られたことを確認した。

2. FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例1の4項に記載のFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株であるCHO/DG44細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の1項で作製したsTNFR_{II}-Fc融合蛋白質発現ベクターpKANTEX93/sTNFR_{II}-Fcを導入して、sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の安定生産細胞を実施例2の2項に記載の方法で作製した。

【0280】

最終的に600 μ g/mLのG418および200nMのMTXを含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質を生産する形質転換株を取得した。FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株をKC1194と名付けた。

3. sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の精製

本実施例の2項で作製したsTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の生産細胞から実施例2の4項に記載の方法でsTNFR_{II}-Fc融合蛋白質を精製した。以後、精製したsTNFR_{II}-Fc融合蛋白質はそれぞれKC1194により生産されるsTNFR_{II}-Fc(-)および親株のCHO/DG44細胞により生産されるsTNFR_{II}-Fc(+)と表記する。

4. 精製sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の分析

本実施例の3項で精製したsTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)の精製度およびFc領域中に付加している糖鎖中のフコース含量を以下の様にして確認した。

(1) sTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)の精製度の評価

本実施例の3項で精製した各精製sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の約3 μ gを用いてSDS-PAGEを行った。

【0281】

結果を図18に示した。二種類の精製蛋白質はそれぞれ、非還元条件下は約140kDa、還元条件下では約70kDaのバンドとして検出された。この結果は、sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の分子量が、非還元条件下では約140kDaであり、還元条件下では分子内のS-S結合が切断され、約70kDaの構成単位に分解されるという報告(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 36, 61-71)と一致し、宿主の異なる二種類のsTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)で泳動パターンが類似していることから、sTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)が目的に合致したポリペプチド鎖として発現されていることが示唆された。

(2) 精製sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の単糖組成分析

本実施例の3項で得られたsTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)の精製標品の単糖組成分

析を、実施例2の5項(2)に記載の方法で行った。但し、sTNFR_{II}には2箇所のN-グリコシド結合複合型糖鎖結合部位が存在し、さらに複数のO-グリコシド結合型糖鎖結合部位も存在することが知られているため、各精製sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質からFc領域の断片を精製し、該断片を用いて単糖組成分析を行った。

【0282】

各精製sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質500 μ gとリシルエンドペプチダーゼ5 μ gを50mmol/Lトリス緩衝液pH8.5に懸濁し、総量5mLとして37℃、1時間反応させた。反応直後にMabSelect (ファルマシア社製) カラムを使用説明書に従い、用いてFc領域の断片を精製した。

表3に各蛋白質の単糖組成比により計算される、全N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を示した。sTNFR_{II}-Fc(+)ではフコースが結合していない糖鎖の割合が7%であった。一方、sTNFR_{II}-Fc(-)ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ100%と見積もられた。

【0283】

以上の結果より、sTNFR_{II}-Fc(-)のN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

(表3)

sTNFR _{II} -Fc融合蛋白質のフコース非含有糖鎖の割合	
蛋白質名	フコースを含まない糖鎖率 (%)
sTNFR _{II} -Fc (+)	7%
sTNFR _{II} -Fc (-)	~100%

【実施例5】

【0284】

sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の活性評価

1. sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の抗TNFR_{II}抗体に対する反応性 (ELISA法)

抗TNFR_{II}抗体 (R&D社製) をPBSで希釈して1 μ g/mLとし、96穴のELISA用プレート (グラインナー社製) に、50 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩静置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 μ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを除去し、sTNFR_{II}-Fc (-) またはsTNFR_{II}-Fc (+) を50 μ L/ウェルに加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、PBSで500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc)抗体溶液 (American Qualex社製) を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

【0285】

結果を図19に示した。sTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)は、濃度依存的に抗TNFR_{II}抗体に結合することが確認でき、その結合はほぼ同等であったことから、作製した糖鎖構造の異なる二種類のsTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)の糖鎖に起因する抗TNFR_{II}抗体に対する反応性に違いが無いことが確認された。

2. sTNFR_{II}-Fc融合蛋白質のFc γ 受容体IIIa結合活性 (ELISA法)

実施例3の3項に記載の方法と同様に行った。但し、測定したsTNFR_{II}-Fc融合蛋白質の濃度範囲は100nmol/Lからとした。

【0286】

結果を図20に示した。sTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)について濃度依存的な結合が確認され、Fc γ RIIIaに対するsTNFR_{II}-Fc(-)の結合活性は、sTNFR_{II}-Fc(+)の結合活性よりも高いものであり、二種類のFc γ RIIIaの多形で同様であった。また、sTNFR_{II}-Fc(-)およびsTNFR_{II}-Fc(+)とFc γ RIIIaとの間に結合が確認されたことより、sTNFR_{II}-FcのFc領域は、Fc γ RIIIaと結合しうる正常な立体構造をとっていることが示された。

【実施例6】

【0287】

CD2結合性LFA-3ドメイン-Fc融合蛋白質 (LFA-3-Fc) の作製

1. LFA-3-Fc発現ベクターの作製

(1) CD2結合性LFA-3ドメインをコードするDNAの構築

USP5914111に記載のCD2結合性LFA-3ドメインとFc融合蛋白質をコードするcDNAをPCR法を用いて以下のように構築した。

【0288】

配列番号38に記載の配列には、CD2結合性LFA-3ドメインをコードする配列の5'末端に9塩基の非翻訳領域とLFA-3の分泌シグナル配列を組み入れた。3'末端にはヒトFcのヒンジ(N末から5残基欠損したもの)とCH2領域の一部を組み入れた。更に配列の5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列(クローニングベクターおよび発現ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約120-140塩基ずつ計4本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号39、40、41および42の4本の合成オリゴヌクレオチドを合成した(ファスマック社製)。

【0289】

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに0.4 μ M M13 primer RV(宝酒造社製)、0.4 μ M M13 primer M3(GENSET社製)および2.5単位のKOD polymerase(東洋紡績社製)を用いて、合計50 μ lとし、PCR反応を行った。反応条件は94℃30秒間、55℃30秒間、74℃60秒間のサイクルを25サイクル、その後74℃5分間を1サイクルで行った。該反応液をQIA quick PCR purification kit(QIAGEN社製)にて精製し、制限酵素KpnI(New England Biolabs社製)および制限酵素AlwNI(New England Biolabs社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、約0.42kbのKpnI-AlwNI断片を回収した。

【0290】

次に、実施例4.の1項(2)で作製したプラスミドpBsIISK(-)/hC γ 1を制限酵素AlwNI(New England Biolabs社製)および制限酵素AflIII(New England Biolabs社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、約1.1kbのAlwNI-AflIII断片を回収した。一方で、同プラスミドを制限酵素AflIII(New England Biolabs社製)および制限酵素KpnI(New England Biolabs社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、約2.5kbのAflIII-KpnI断片を回収した。

【0291】

上記で得たPCR由来のKpnI-AlwNI断片、プラスミドpBsIISK(-)/hC γ 1由来のAlwNI-AflIII断片およびプラスミドpBsIISK(-)/hC γ 1由来のAflIII-KpnI断片をLigation High溶液(東洋紡績社製)を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5a株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3(Applied Biosystems社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM377により各プラスミドに挿入されたPCR断片の塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する図21に示したプラスミドpBsIISK(-)/LFA-3-Fcが得られたことを確認した。

【0292】

(2) LFA-3-Fc融合蛋白質発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と実施例6の1項(1)で得られたプラスミドpBsIISK(-)/LFA-3-Fcを用いてLFA-3-Fc融合蛋白質発現ベクターpKANTEX93/LFA-3-Fcを以下の様にして構築した。

本項(1)で得られたプラスミドpBsIISK(-)/LFA-3-Fcを制限酵素EcoRI(宝酒造社製)と制限酵素XcmI(New England Biolabs社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気

泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約0.1kbのEcoRI-XcmI断片を回収した。

【0293】

次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93を制限酵素XcmI (New England Biolabs社製) とBamHI (New England Biolabs社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約1.0kbのXcmI-BamHI断片を回収した。同プラスミドを制限酵素BamHI (New England Biolabs社製) とEcoRI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約9.3kbのBamHI-EcoRI断片を回収した。

【0294】

次に、上記で得られたpBsIISK(-)/LFA-3-Fc由来EcoRI-XcmI断片とプラスミドpKANTEX93由来のXcmI-BamHI断片とBamHI-EcoRI断片をLigation High溶液(東洋紡績社製)を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5a株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems社製)を用いて同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列の解析を行った。解析の結果、目的の塩基配列を有する図22に示したプラスミドpKANTEX93/LFA-3-Fcを得た。

2. FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例1の4項に記載のFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株であるCHO/DG44細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の1項で作製したLFA-3-Fc融合蛋白質発現ベクターpKANTEX93/LFA-3-Fcを導入して、LFA-3-Fc融合蛋白質の安定生産細胞を実施例2の2項に記載の方法で作製した。ただし、デヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を利用した遺伝子増幅は行っていない。

【0295】

最終的に600 μ g/mLのG418を含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、LFA-3-Fc融合蛋白質を生産する形質転換株を取得した。FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株をKC1198と名付けた。

3. CD2結合性LFA-3ドメイン-Fc融合蛋白質の精製

上記実施例6の2項で作製したLFA-3-Fc融合蛋白質の生産細胞をEXCELL301培地(JRH社製)を用いて1000mLのスケールで培養した。培養上清より実施例2の4項に記載の方法でLFA-3-Fc融合蛋白質を精製した。以後、精製したLFA-3-Fc融合蛋白質はそれぞれ親株のCHO/DG44細胞により生産されるLFA-3-Fc(+)と、KC1198により生産されるLFA-3-Fc(-)と表記する。

4. 精製LFA-3-Fc融合蛋白質の分析

本実施例の3項で精製したLFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)の精製度およびFc領域中に付加している糖鎖中のフコース含量を以下の様にして確認した。

(1) LFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)の精製度の評価

各精製LFA-3-Fc融合蛋白質の約2 μ gを用いてSDS-PAGEを行った。結果を図23に示した。二種類の精製蛋白質はそれぞれ、非還元条件下は約115kDa、還元条件下では約60kDaのバンドとして検出された。この結果は、LFA-3-Fc融合蛋白質の分子量が、非還元条件下では約115kDaであり、還元条件下では分子内のS-S結合が切断され、約60kDaの構成単位に分解されるという報告(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 36, 61-71)と一致し、宿主の異なる二種類のLFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)で泳動パターンが類似していることから、LFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)が発現ベクターにコードされた通りのポリペプチド鎖として発現されていることが示唆された。

(2) 精製LFA-3-Fc融合蛋白質の単糖組成分析

本実施例の3項で得られたLFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)の精製標品の単糖組成分析を実施例2の5項(2)に記載の方法で行った。但し、CD2結合性LFA-3ドメインには3箇所のN-グリコシド結合複合型糖鎖結合部位が存在(USP5614111)することが知られているため、

各精製LFA-3-Fc融合蛋白質からFc領域の断片を精製し、該断片を用いて単糖組成分析を行った。

【0296】

実施例6の3項で精製したLFA-3-Fc融合蛋白質各500 μ gとリシルエンドペプチダーゼ5 μ gを50mmol/Lトリス緩衝液pH8.5に懸濁し、総量5mLとして37℃、1時間反応させた。反応直後にMabSelect（ファルマシア社製）カラムを使用説明書に従い、用いてFc断片を精製した。

表4に各蛋白質の単糖組成比により計算される、全N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を示した。LFA-3-Fc(+)ではフコースが結合していない糖鎖の割合が7%であった。一方、LFA-3-Fc(-)ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ100%と見積もられた。

【0297】

以上の結果より、LFA-3-Fc(-)のN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

(表4)

LFA-3-Fc融合蛋白質のフコース非含有糖鎖の割合	
蛋白質名	フコースを含まない糖鎖率 (%)
LFA-3-Fc (+)	7%
LFA-3-Fc (-)	~100%

【実施例7】

【0298】

CD2結合性LFA-3ドメイン-Fc融合蛋白質の活性評価

1. 膜表面上のCD2分子への結合性(蛍光抗体法)

実施例6の3項で作製したLFA-3-Fc融合蛋白質であるLFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc (+)との結合活性を有するCD2に対する反応性を、蛍光抗体法により以下のように検討した。CD2発現細胞株としては、CCRF-CEM細胞(ATCC CCL-119)を用いた。

【0299】

1ウェル当たり2 \times 10⁵個のCCRF-CEM細胞を96ウェルU字プレートに分注し、公知の方法（酵素抗体法：学際企画刊（1985））でLFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc (+)をFACS用緩衝液で435nmol/Lから適宜希釈した溶液を100 μ L/ウェルとして加え、氷中で30分間反応させた。FACS用緩衝液で2回洗浄後、PE標識抗ヒトIgG(Fc γ) 抗体(ベックマン・コールター社製)をFACS用緩衝液にて50倍に希釈した溶液を50 μ L/ウェルで加えた。遮光し氷中で30分間反応後、FACS用緩衝液で3回洗浄し、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。

【0300】

図24に示したように、LFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)のCD2への結合活性は同程度であった。CD2とLFA-3の結合には糖鎖修飾の影響が大きいと報告されているが（Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 11,1 (1999)）、フコースの結合していないLFA-3-Fc(-)分子でもその結合活性には影響を及ぼさないことが示された。

2. Fc γ RIIIaへの結合活性

実施例3の3項に記載の方法と同様に行った。但し、測定したLFA-3-Fc融合蛋白質の濃度範囲は33nmol/Lからとした。

【0301】

結果を図25に示した。LFA-3-Fc(-)およびsLFA-3-Fc(+)は濃度依存的にFc γ RIIIaに結合することが確認され、Fc γ RIIIaに対するLFA-3-Fc(-)のFc γ RIIIaに対する結合活性は、LFA-3-Fc(+)のそれよりも高いものであった。この結果は、二種類のFc γ RIIIaの多形で同様の結果であった。

LFA-3-Fc(-)とLFA-3-Fc(+)の間には、Fc γ RIIIaに対する結合活性およびFc領域に結合する糖鎖中のフコース含量に差が認められており、Fc γ RIIIaに対する結合活性の差はFc

領域に結合する糖鎖中のフコース含量の差に起因していることを明確に示したものである。一方、LFA-3領域のフコース含量はCD2との結合には何ら影響を与えないことから、抗体Fc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンのフコースを除去することで、抗体Fc領域が介在するエフェクター活性を人為的に調節できることを明確に示している。

参考例

可溶性ヒトFcγRIIIa蛋白質の作製

1. 可溶性ヒトFcγRIIIa蛋白質の発現ベクターの構築

(1) ヒト末梢血単核球cDNAの作製

実施例3の5項(2)に記載の方法に従って、健常人の静脈血 30mLから、RPMI1640-FBS(10)中に懸濁した 2×10^6 個/mLの末梢血単核球懸濁液を調製した。該末梢血単核球懸濁液の5mLを室温下800rpmで5分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、5mLのPBSに懸濁した。室温下800rpmで5分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、全RNAを抽出した。

【0302】

得られた全RNA $2 \mu\text{g}$ に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製)を用いて添付の説明書に従い、オリゴ(dT)をプライマーとして逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。

(2) ヒトFcγRIIIa蛋白質をコードするcDNAの取得

ヒトFcγRIIIa蛋白質(以下、hFcγRIIIaと表記する)のcDNAの取得は、以下の様に行なった。

【0303】

まず、hFcγRIIIaのcDNAの塩基配列[ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン(J. Exp. Med.), 170, 481 (1989)]より、翻訳開始コドンを含む特異的なフォワードプライマー(配列番号44に示す)および翻訳終止コドンを含む特異的なリバースプライマー(配列番号45に示す)を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いて、本項(1)で調製したヒト末梢血単核球由来のcDNA溶液の20倍希釈液 $5 \mu\text{L}$ を含む $50 \mu\text{L}$ の反応液[1倍濃度のExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、 $1 \mu\text{M}$ 上記遺伝子特異的プライマー(配列番号44および45)]を調製し、PCRを行った。PCRは、 94°C で30秒間、 56°C で30秒間、 72°C で60秒間からなる反応を1サイクルとして、35サイクル行った。

【0304】

PCR後、該反応液をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、滅菌水 $20 \mu\text{L}$ に溶解した。制限酵素EcoRI(宝酒造社製)およびBamHI(宝酒造社製)で消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、PCR由来の約800bpの断片を回収した。

一方、プラスミドpBluescriptII SK(-) $2.5 \mu\text{g}$ (Stratagene社製)を制限酵素EcoRI(宝酒造社製)およびBamHI(宝酒造社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約2.9kbpの断片を回収した。

【0305】

上記で得たヒト末梢血単核球cDNA由来増幅断片とプラスミドpBluescriptII SK(-)由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver. 2.0(宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5α株(東洋紡績社製)を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377により各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列を決定した。本法により配列決定した全ての挿入cDNAが、hFcγRIIIaのcDNAのORF全長配列をコードすることを確認した。結果として2種類のhFcγRIIIaをコードするcDNAを得た。一つは、配列番号46に示した配列であり、該配列を含むプラスミドとしてpBSFcγRIIIa5-3を得た。配列番号46の塩基配列に対応するアミノ酸配列を配列番号47に示す。もう一つは、配列番号48に示した配列であり、該配列を含むプラスミドとしてpBSFcγRIIIa3を得た。配

列番号48の塩基配列に対応するアミノ酸配列を配列番号49に示す。配列番号46と配列番号48の違いは、538番目の塩基がそれぞれTとGであり、その結果、対応するアミノ酸配列は、配列上、176番目がそれぞれPheとValであった。以下、配列番号47記載のアミノ酸配列のhFc γ RIIIaをhFc γ RIIIa(F)、配列番号49記載のアミノ酸配列のhFc γ RIIIaをhFc γ RIIIa(V)と称す。

(3) 可溶性hFc γ RIIIa(F)をコードするcDNAの取得

hFc γ RIIIa(F)の細胞外領域(配列番号47の1~193番目)とC末端にHis-tag配列を持つ可溶性hFc γ RIIIa(F)[以下、shFc γ RIIIa(F)と表記する]をコードするcDNAを以下の様にして構築した。

【0306】

まず、配列番号46に示されるhFc γ RIIIa(F)のcDNAの塩基配列より、細胞外領域に特異的なプライマーFc γ R3-1(配列番号50に示す)を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いて、本項(2)で作製したプラスミドpBSFc γ RIIIa5-3をテンプレートとして含む反応液[1倍濃度のExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、1 μ MプライマーFc γ R3-1、1 μ MプライマーM13M4(宝酒造社製)]を調製し、PCRを行った。PCRは、94℃で30秒間、56℃で30秒間、72℃で60秒間からなる反応を1サイクルとして、35サイクル行った。

【0307】

PCR後、反応液をQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて精製し、滅菌水20 μ Lに溶解した。制限酵素PstI(宝酒造社製)およびBamHI(宝酒造社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約110bpを回収した。

一方、プラスミドpBSFc γ RIIIa5-3を制限酵素PstI(宝酒造社製)およびBamHI(宝酒造社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約3.5kbpの断片を回収した。

【0308】

上記で得たhFc γ RIIIa(F) cDNA由来増幅断片とプラスミドpBSFc γ RIIIa5-3由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0(宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Parkin Elmer社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサー377により各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列を解析し、図●に示されるpBSFc γ RIIIa(F)+His3が得られたことを確認した。

【0309】

決定したshFc γ RIIIa(F)の全長cDNA配列を配列番号51、それに対応するシグナル配列を含むアミノ酸配列を配列番号52に示す。配列番号52において、N末端メチオニンから176番目のアミノ酸残基はフェニルアラニンであった。

(4) 可溶性hFc γ RIIIa(V)をコードするcDNAの取得

hFc γ RIIIa(V)の細胞外領域(配列番号49の1~193番目)とC末端にHis-tag配列を持つ可溶性hFc γ RIIIa(V)[以下、shFc γ RIIIa(V)と記す]をコードするcDNAを以下のようにして構築した。

【0310】

本項(2)で得られたプラスミドpBSFc γ RIIIa3を制限酵素AlwNI(New England Biolabs社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、hFc γ RIIIa(V)の5'末端側を含む約2.7kbpの断片を回収した。

本項(3)で得られたプラスミドpBSFc γ RIIIa(F)+His3を制限酵素AlwNI(New England Biolabs社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、hFc γ RIIIaの3'末端側とHis-tag配列を含む約920bpの断片を回収した。

【0311】

上記で得たプラスミドpBSFc γ RIIIa3由来の断片とプラスミドpBSFc γ RIIIa(F)+His3由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0(宝酒造社製)により連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換した。得られた形質転換株のクロー

ンより各プラスミドDNAを調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサー377により各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列を解析し、図○に示されるpBS Fc γ RIIIa+His2が得られたことを確認した。

【0312】

決定したshFc γ RIIIa(F)の全長cDNA配列を配列番号53、それに対応するシグナル配列を含むアミノ酸配列を配列番号54に示す。配列番号54において、N末端メチオニンから176番目のアミノ酸残基はバリンであった。

(5) shFc γ RIIIa(F)およびshFc γ RIIIa(V)の発現ベクターの構築

shFc γ RIIIa(F)およびshFc γ RIIIa(V)の発現ベクターは、以下のようにして構築した。

【0313】

本項(3)および(4)で得られたプラスミドpBSFc γ RIIIa+His3およびpBSFc γ RIIIa+His2のそれぞれを制限酵素EcoRI(宝酒造社製)およびBamHI(宝酒造社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、それぞれ約620bpの各断片を回収した。

一方、プラスミドpKANTEX93を制限酵素EcoRI(宝酒造社製)およびBamHI(宝酒造社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約10.7kbpの断片を回収した。

【0314】

上記で得たshFc γ RIIIa(F)cDNAおよびshFc γ RIIIa(V)cDNAを含む各DNA断片とプラスミドpKANTEX93由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0(宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサー377により各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列を解析し、目的のshFc γ RIIIa(F)cDNAを含む発現ベクターpKANTEXFc γ RIIIa(F)-HisおよびshFc γ RIIIa(V)cDNAを含む発現ベクターpKANTEXFc γ RIIIa(V)-Hisが得られたことを確認した。

2. shFc γ RIIIaの安定生産細胞の作製

本参考例の1項で構築したshFc γ RIIIaの発現ベクターpKANTEXFc γ RIIIa(F)-HisおよびpKANTEXFc γ RIIIa(V)-HisをラットミエロマYB2/0細胞[ATCC CRL-1662、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジー(J. Cell. Biol.), 93, 576 (1982)]に導入し、二種類のshFc γ RIIIaの安定生産細胞を以下の様にして作製した。

【0315】

制限酵素AatIIで消化し、線状化したpKANTEXFc γ RIIIa-Hisの10 μ gを4 \times 10⁶個のYB2/0細胞へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]で導入後、40mLのHybridoma-SFM-FBS(10)[10%FBSを含むHybridoma-SFM培地(Life Technologies社製)]に懸濁し、96ウェル培養用プレート(住友ベークライト社製)に200 μ L/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を1.0mg/mLになるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中のshFc γ RIIIaの発現量を本参考例の5項に示すELISA法により測定した。

【0316】

培養上清中にshFc γ RIIIaの発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用してshFc γ RIIIa生産量を増加させる目的で、G418を1.0mg/mL、DHFRの阻害剤であるMTX(SIGMA社製)を50nM含むHybridoma-SFM-FBS(10)培地に1~2 \times 10⁵細胞/mLになるように懸濁し、24ウェルプレート(Greiner社製)に2mLずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中のshFc γ RIIIaの発現量を本参考例の5項に示すELISA法により測定した。培養上清中にshFc γ RIIIaの発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を1.0mg/mL、MTXを200nMの濃度で含むHybridoma-SFM-FBS(10)培地で増殖可能かつ、shFc γ RIIIaを高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株に対

して、2回の限界希釈法によるクローン化を行った。shFc γ RIIIa(F)を生産する形質転換細胞クローンKC1107およびshFc γ RIIIa(V)を生産する形質転換細胞クローンKC1111を得た。

4. shFc γ RIIIaの精製

本参考例の2項で得られたshFc γ RIIIa(F)を生産する形質転換細胞クローンKC1107およびshFc γ RIIIa(V)を生産する形質転換細胞クローンKC1111をG418を1.0mg/mL、MTXを200nmol/Lで含むHybridoma-SFM-GF(5) [5% Daigo's GF21 (和光純薬社製)を含むHybridoma-SFM培地 (LIFE TECHNOLOGIES社製)]に 3×10^5 細胞/mLとなるように懸濁し、182cm²フラスコ (Greiner社製)に50mL分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で4日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりNi-NTA agarose (QIAGEN社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、shFc γ RIIIa(F)およびshFc γ RIIIa(V)を精製した。

5. shFc γ RIIIa(F)およびshFc γ RIIIa(V)の検出 (ELISA法)

培養上清中あるいは精製したshFc γ RIIIa(F)およびshFc γ RIIIa(V)の検出、定量は、以下に示すELISA法により行った。

【0317】

His-tagに対するマウス抗体Tetra・His Antibody (QIAGEN社製)をPBSを用いて5 μ g/mLに調製した溶液を96ウェルのELISA用のプレート (Greiner社製)に50 μ L/ウェルで分注し、4℃、12時間以上反応させた。反応後、1%BSA-PBSを100 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清あるいは精製したshFc γ RIIIa(F)およびshFc γ RIIIa(V)の各種希釈溶液を50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで50倍に希釈したビオチン標識マウス抗ヒトCD16抗体溶液 (PharMingen 社製)を50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで4000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識Avidin D溶液 (Vector 社製)を50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、5分後に5%SDS溶液を50 μ L/ウェルで加えて反応を停止させた。その後、OD415を測定した。

【図面の簡単な説明】

【0318】

【図1】図1は、プラスミドpKOFUT8Neoの構築を示した図である。

【図2】図2は、CHO/DG44細胞のFUT8対立遺伝子を1コピー破壊したヘミノックアウトクローンのゲノムサザンの解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ヘミノックアウトクローン50-10-104および親株であるCHO/DG44細胞のゲノムサザンである。

【図3】図3は、CHO/DG44細胞のFUT8両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンWK704のゲノムサザン解析結果を示した図である。矢印は、相同組換えが起こった際に検出される陽性断片の検出位置を示す。

【図4】図4は、CHO/DG44細胞のFUT8両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンより薬剤耐性遺伝子を除去したクローンのゲノムサザン解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子除去クローン4-5-C3、ダブルノックアウトクローンWK704、ヘミノックアウトクローン50-10-104および親株であるCHO/DG44細胞のゲノムサザンである。

【図5】図5は、プラスミドpBSIISK(-)/CC49VHを示した図である。

【図6】図6は、プラスミドpBSIISK(-)/CC49VLを示した図である。

【図7】図7は、プラスミドpKANTEX93/CC49scFv-Fcを示した図である。

【図8】図8は、精製した抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の還元状態および非還元状態におけるSDS-PAGEの電気泳動パターンを示した図である。蛋白質の染色は、クーマシーブリリアントブルー (CBB) で行った。

【図9】図9は、抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の抗原であるTAG-72が発現しているJurkat細胞への結合性を、蛋白質濃度を変化させて測定した図であ

る。(A)は抗TAG-72 scFv-Fc(+)、(B)は抗TAG-72 scFv-Fc(-)、(C)は陰性対照であるKM8404での結果をそれぞれ示す。各種サンプルの濃度は、(1)は非添加、(2)は50 μ g/mL、(3)は2 μ g/mLでそれぞれ測定した結果を示す。

【図10】図10は、精製した抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の抗原であるTAG-72に対するELISA法における反応性を、サンプル濃度を変化させて測定した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における吸光度を示す。●が抗TAG-72 scFv-Fc(-)、○が抗TAG-72 scFv-Fc(+)、△が陰性対照であるKM8404をそれぞれ示す。

【図11】図11は、精製した抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の抗原TAG-72非存在下でのFc γ RIIIaに対する反応性を、蛋白質濃度を変化させて測定した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における吸光度を示す。●が抗TAG-72 scFv-Fc(-)、○が抗TAG-72 scFv-Fc(+))をそれぞれ示す。図11のAはFc γ RIIIa(F)、図11のBはFc γ RIIIa(V)での結果をそれぞれ示す。

【図12】図12は、精製した抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の抗原TAG-72存在下でのFc γ RIIIaに対する反応性を、サンプル濃度を変化させて測定した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における吸光度を示す。●が抗TAG-72 scFv-Fc(-)、○が抗TAG-72 scFv-Fc(+))をそれぞれ示す。図12のAはFc γ RIIIa(F)、図12のBはFc γ RIIIa(V)での結果をそれぞれ示す。

【図13】図13は、精製した抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)のTAG-72が発現しているJurkat細胞およびTAG-72が発現していないRaji細胞に対するADCC活性を、サンプル濃度を変化させて測定した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における細胞傷害活性を示す。●が抗TAG-72 scFv-Fc(-)、○が抗TAG-72 scFv-Fc(+))をそれぞれ示す。図13のAはJurkat細胞、図13のBはRaji細胞での測定結果をそれぞれ示す。

【図14】図14は、プラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-1を示した図である。

【図15】図15は、プラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-2を示した図である。

【図16】図16は、プラスミドpBsIISK(-)/sTNFRII-Fcを示した図である。

【図17】図17は、プラスミドpKANTEX93/sTNFRII-Fcを示した図である。

【図18】図18は、精製したsTNFRII-Fc(-)およびsTNFRII-Fc(+)のSDS-PAGEの還元状態および非還元状態における電気泳動パターンを示した図である。蛋白質の染色は、クーマシーブリリアントブルー (CBB) で行った。

【図19】図19は、精製したsTNFRII-Fc(-)およびsTNFRII-Fc(+)の抗TNFRII抗体との結合活性を、サンプル濃度を変化させて測定した図である。縦軸は抗TNFRII抗体との結合活性を、横軸はサンプル濃度を示す。○がsTNFRII-Fc(+))、●がsTNFRII-Fc(-)、の活性をそれぞれ示す。

【図20】図20は、精製したsTNFRII-Fc(-)およびsTNFRII-Fc(+)のshFc γ RIIIaに対する結合活性を、サンプル濃度を変化させて測定した図である。両図ともに、横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における結合活性を示す。○がsTNFRII-Fc(+))、●がsTNFRII-Fc(-)の活性をそれぞれ示す。AがshFc γ RIIIa(Phe)型、BがshFc γ RIIIa(Val)型の多系に対する活性を示す。

【図21】図21は、プラスミドpBsIISK(-)/LFA-3-Fcを示した図である。

【図22】図22は、プラスミドpKANTEX93/LFA-3-Fcを示した図である。

【図23】図23は、精製したLFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)の還元状態および非還元状態におけるSDS-PAGEの電気泳動パターンを示した図である。蛋白質の染色は、クーマシーブリリアントブルー (CBB) で行った。

【図24】図24は、精製したLFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)のCD2発現細胞株に対する結合活性を、蛍光抗体法を用いてサンプル濃度を変化させて測定した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における平均蛍光強度を示す。○がLFA-3-Fc(+))、●がLFA-3-Fc(-)の活性をそれぞれ示す。

【図25】図25は、精製したLFA-3-Fc(-)およびLFA-3-Fc(+)のshFc γ RIIIaに対す

る結合活性を、サンプル濃度を変化させて測定した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における結合活性を示す。○がLFA-3-Fc(+)、●がLFA-3-Fc(-)の活性をそれぞれ示す。AがshFc γ RIIIa(Phe)型、BがshFc γ RIIIa(Val)型の多系に対する活性を示す。

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Fc-fused protein composition

<160> 65

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1504

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<400> 1

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac	48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp	
1 5 10 15	

ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc	96
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr	
20 25 30	

ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac	144
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr	
35 40 45	

gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga	192
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg	
50 55 60	

att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg	240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met	
65 70 75 80	

aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc	288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile	
85 90 95 100	

atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc	336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser	
105 110 115	

cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat	384
---	-----

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp	
120 125 130	
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt	432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu	
135 140 145	
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga	480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly	
150 155 160	
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg	528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg	
165 170 175 180	
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac	576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn	
185 190 195	
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat	624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn	
200 205 210	
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc	672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser	
215 220 225	
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg	720
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu	
230 235 240	
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc	768
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val	
245 250 255 260	
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc	816
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val	
265 270 275	
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca	864
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser	
280 285 290	
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat	912
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn	
295 300 305	
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat	960
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp	
310 315 320	

ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc 1008
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325 330 335 340

tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac 1056
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
345 350 355

gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc 1104
Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
360 365 370

aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaattc gcgagacatg gactatggtg 1159
Asn Pro Asn Ala
375

cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagacat cgaccataaa ccctcgactg 1219
cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279
actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat 1339
caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaat 1399
ttttgagtct tgagattgtt ttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459
aaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 2

<211> 376

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 2

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
65 70 75 80

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
85 90 95 100

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser

105	110	115
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu	Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp	
120	125	130
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu	Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu	
135	140	145
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr	Ser Glu Leu Tyr Gly	
150	155	160
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr	Thr Pro Phe Tyr Pro Arg	
165	170	175 180
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp	Ile Val Val Asn	
185	190	195
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly	Ile Leu Phe Asn	
200	205	210
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr	Arg Lys Ile Ser	
215	220	225
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu		
230	235	240
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val		
245	250	255 260
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val		
265	270	275
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser		
280	285	290
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn		
295	300	305
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp		
310	315	320
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys		
325	330	335 340
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp		
345	350	355
Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr		
360	365	370

Asn Pro Asn Ala
375

<210> 3

<211> 1316

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 3

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60
tggactggtg gaaccttgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
gatcctagtg acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180
tggcgctggc ttacccggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240
ggatgcagca caaacccaag ccctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300
tgctgcaatg gtaggaggcc ttttccggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctacgctttc gaggtgggca ctgcgaaggt 420
ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
tggcctcatc cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctactggac ctagcccggc tcttcatctg 780
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtgggggaagt 900
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
tgcctggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080
tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca tttgcttgtc aagaactgag 1140
gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200

atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca ccttgtttgt 1260

ctgtttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 4

<211> 321

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 4

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
305 310 315 320

Lys

<210> 5

<211> 2008

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 5

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattctt 60
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120
tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180
catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat cttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
tttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600

tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttggg atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggctctg gcctctccac tggacactgg tcagggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggctgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctctttactt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatacctgc agtgtgggtg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata ctgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
cggggcgatga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
cctacatatc ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
gaagggtctg tgtgccctca agcccatg 2008

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atgcgggcat ggactggttc ctggcggttg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
ttgttatttt atataggtgg tcatttgggt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120
agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggt gatgggagac tgtgttttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggccctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggctcgag ctccccattg tagacagcct ccctcctcgg 900
cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaact acttgattcg tccacaacct 1020
tggtctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320
cggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380

gactttctag tgtgtacttt.ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
 accctgcatc ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
 ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt tatcctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560
 attccaatgg aacctggaga tatcattgggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620
 aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
 aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 7

<211> 575

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 7

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
165 170 175

Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
565 570 575

<210> 8

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95
 Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110
 Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125
 Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140
 Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175
 Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Asp His Ala Ile His
1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly
1 5 10 15

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11
Ser Leu Asn Met Ala Tyr
1 5

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
1 5 10 15

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13
Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu
 100 105 110

Lys
 113

<210> 17

<211> 497

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130	135	140
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu		
145	150	155 160
Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln		
	165	170 175
Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln		
	180	185 190
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala		
	195	200 205
Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
	210	215 220
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val		
	225	230 235 240
Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly		
	245	250 255
Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys		
	260	265 270
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
	275	280 285
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
	290	295 300
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
	305	310 315 320
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
	325	330 335
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
	340	345 350
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
	355	360 365
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	370	375 380
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	385	390 395 400

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 485 490 495

Lys
 497

<210> 18

<211> 463

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

ccg gaa ttc gac ccc tca cca tgg aat gga gct ggg tct ttc tct tct	48
tcc tgt cag taa cta cag gtg tcc act ccc agg ttc agt tgc agc agt	96
ctg acg ctg agt tgg tga aac ctg ggg ctt cag tga aga ttt cct gca	144
agg ctt ctg gct aca cct tca ctg acc atg caa ttc act ggg tga aac	192
aga acc ctg aac agg gcc tgg aat gga ttg gat att ttt ctc ccg gaa	240
atg atg att tta aat aca atg aga ggt tca agg gca agg cca cac tga	288
ctg cag aca aat cct cca gca ctg cct acg tgc agc tca aca gcc tga	336
cat ctg agg att ctg cag tgt att tct gta cca gat ccc tga ata tgg	384
cct act ggg gtc aag gaa cct cag tca ccg tct cct cag gtg gcg gag	432
gca gcg gag gcg gtg gct ccg gaa cta gtc c	463

<210> 19
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 19
ccg gaa ttc gac ccc tca cca tgg aat gga gct ggg tct ttc tct tct 48
tcc tgt cag taa cta cag gtg tcc act ccc agg ttc agt tgc agc agt 96
ctg acg ctg agt tgg tga aac ctg ggg ctt cag 129

<210> 20
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 20
cat ttc cgg gag aaa aat atc caa tcc att cca ggc cct gtt cag ggt 48
tct gtt tca ccc agt gaa ttg cat ggt cag tga agg tgt agc cag aag 96
cct tgc agg aaa tct tca ctg aag ccc cag gtt tca cc 134

<210> 21
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 21
gga tat ttt tct ccc gga aat gat gat ttt aaa tac aat gag agg ttc 48
aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc act gcc tac 96
gtg cag ctc aac agc ctg aca tct gag gat tct gc 131

<210> 22
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 22
 gga cta gtt ccg gag cca ccg cct ccg ctg cct ccg cca cct gag gag 48
 acg gtg act gag gtt cct tga ccc cag tag gcc ata ttc agg gat ctg 96
 gta cag aaa tac act gca gaa tcc tca gat gtc agg 132

<210> 23
 <211> 536
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 23
 ccg gaa ttc tcc gga ggc gga ggc tcg gac att gtg atg tca cag tct 48
 cca tcc tcc cta cct gtg tca gtt ggc gag aag gtt act ttg agc tgc 96
 aag tcc agt cag agc ctt tta tat agt ggt aat caa aag aac tac ttg 144
 gcc tgg tac cag cag aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg att tac 192
 tgg gca tcc gct agg gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt 240
 gga tct ggg aca gat ttc act ctc tcc atc agc agt gtg aag act gaa 288
 gac ctg gca gtt tat tac tgt cag cag tat tat agc tat ccc ctc acg 336
 ttc ggt gct ggg acc aag ctg gtg ctg aaa cgg gcc gcc gag ccc aaa 384
 tct cct gac aaa act cac acg tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc 432
 ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc 480
 ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg 528
 act agt cc 536

<210> 24
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

tct gaa ttc tcc gga ggc gga ggc tcg gac att gtg atg tca cag tct 48

cca tcc tcc cta cct gtg tca gtt ggc gag aag gtt act ttg agc tgc 96

aag tcc agt cag agc ctt tta tat agt ggt aat caa aag aac tac ttg 144

gcc tgg 150

<210> 25
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

cac act gct gat gga gag agt gaa atc tgt ccc aga tcc act gcc tgt 48

gaa gcg atc agg gac ccc aga ttc cct agc gga tgc cca gta aat cag 96

cag ttt agg aga ctg ccc tgg ttt ctg ctg gta cca ggc caa gta gtt 144

ctt ttg 150

<210> 26
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

ctc tct cca tca gca gtg tga aga ctg aag acc tgg cag ttt att act 48

gtc agc agt att ata gct atc ccc tca cgt tcg gtg ctg gga cca agc 96

tgg tgc tga aac ggg ccg ccg agc cca aat ctc ctg aca aaa ctc aca 144

cgt gc

149

<210> 27

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

gga cta gtc acg tcc acc acc acg cat gtg acc tca ggg gtc cgg gag 48

atc atg agg gtg tcc ttg ggt ttt ggg ggg aag agg aag act gac ggt 96

ccc ccc agg agt tca ggt gct ggg cac ggt ggg cac gtg tga gtt ttg 144

tca gg 149

<210> 28

<211> 526

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

caggaaacag ctatgacggt accgaattcg cgaggcaggc agcctggaga gaaggcgctg 60

ggctgcgagg gcgcgagggc gcgagggcag ggggcaaccg gaccccgccc gcatccatgg 120

cgcccgtcgc cgtctgggcc gcgctggccg tcggactgga gctctgggct gcggcgcacg 180

ccttgcccgc ccaggtggca ttacaccct acgcccgcga gcccgaggagc acatgccggc 240

tcagagaata ctatgaccag acagctcaga tgtgtgcag caaatgctcg ccgggccaac 300

atgcaaaagt cttctgtacc aagacctcg acaccgtgtg tgactcctgt gaggacagca 360

catacaccca gctctggaac tgggttcccc agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct 420

ctgaccaggt ggaaactcaa gcctgcactc gggaacagaa ccgcatctgc acctgcaggc 480

ccggctggta ctgcgcgtg agcaagctta ctggccgtcg ttttac 526

<210> 29
<211> 537
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

caggaaacag ctatgacggt accgctgagc aagcaggagg ggtgccggct gtgcgcgccg 60
ctgcgcaagt gccgcccggg cttcggcgtg gccagaccag gaactgaaac atcagacgtg 120
gtgtgcaagc cctgtgcccc ggggacgttc tccaacacga cttcatccac ggatatttgc 180
aggccccacc agatctgtaa cgtgggtggc atccctggga atgcaagcat ggatgcagtc 240
tgcacgtcca cgtccccac ccggagtatg gcccagggg cagtacactt accccagcca 300
gtgtccacac gatcccaaca cacgcagcca actccagaac ccagcactgc tccaagcacc 360
tccttctgc tcccaatggg cccagcccc ccagctgaag ggagcactgg cgacgagccc 420
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 480
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggaagctt actggccgtc gttttac 537

<210> 30
<211> 150
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

atggcgcccg tcgccgtctg ggccgcgctg gccgtcggac tggagctctg ggctgcggcg 60
cacgccttgc ccgcccaggt ggcatTTaca ccctacgcc cggagcccgg gagcacatgc 120
cggctcagag aatactatga ccagacagct 150

<210> 31
<211> 135
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 31

agacggcgac gggcgccatg gatgcgggcg ggggtccggtt gccccctgcc ctgcgcacct 60

cgcgccctcg cagcccagcg cttctctcc aggtgcctg cctcgcaat tcgtaccgt 120

catagctgtt tcctg 135

<210> 32

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 32

gaactgggtt cccgagtgt tgagctgtgg ctcccgctgt agctctgacc aggtggaaac 60

tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc aggcccggct ggtactgcgc 120

gctgagcaag cttactggcc gtcgttttac 150

<210> 33

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 33

gcactcggga acccagttcc agagctgggt gtatgtgctg tcctcacagg agtcacacac 60

ggtgtccgag gtcttggtac agaagacttt tgcattgttg cccggcgagc atttgctgca 120

gcacatctga gctgtctggt catagtattc 150

<210> 34

<211> 149

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

ctgtgccccg gggacgttct ccaacacgac ttcatccacg gatatttgca ggccccacca 60

gatctgtaac gtggtggcca tccctgggaa tgcaagcatg gatgcagtct gcacgtccac 120

gtccccacc cggagtatgg ccccagggg 149

<210> 35

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

gaacgtcccc ggggcacagg gcttgacac cacgtctgat gtttcagttc ctggtctggc 60

cacgccgaag cccgggcggc acttgcgag cggcgcgcac agccggcacc cctcctgctt 120

gctcagcggg accgtcatag ctgtttcctg 150

<210> 36

<211> 145

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

agctgaaggg agcactggcg acgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 60

gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa 120

ggaagcttac tggccgtcgt ttac 145

<210> 37

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

gccagtgctc ccttcagctg gggggctggg gccattggg agcaggaagg aggtgcttgg 60
agcagtgctg ggttctggag ttggctgcgt gtgttgggat cgtgtggaca ctggctgggg 120
taagtgtact gcccctgggg ccatactccg 150

<210> 38

<211> 452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

caggaaacag ctatgacggt accgaattcc gacgagccat ggttgctggg agcgacgcgg 60
ggcggggccct gggggctcctc agcgtgggtc gcctgctgca ctgcitttgt ttcacagct 120
gtttttccca acaaatatat ggtgttgtgt atgggaatgt aactttccat gtaccaagca 180
atgtgccttt aaaagaggtc ctatggaaaa aacaaaagga taaagttgca gaactggaaa 240
attctgaatt cagagctttc tcacttttta aaaatagggt ttatttagac actgtgtcag 300
gtagcctcac tatctacaac ttaacatcat cagatgaaga tgagtatgaa atggaatcgc 360
caaataattac tgataccatg aagttctttc tttatgtcga caaaactcac acatgcccac 420
cgtgcccagc acctgactgg ccgtcgtttt ac 452

<210> 39

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

gtttcatcag ctgtttttcc caacaaatat atgggtgtgt gtatgggaat gtaactttcc 60
atgtaccaag caatgtgcct ttaaaagagg tcctatggaa aaaacaaaag gataaagttg 120

cagaactgga aaattctg

138

<210> 40

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

gggaaaaaca gctgatgaaa ccaaagcagt gcagcaggca gaccacgctg aggaccccca 60

gggcccgcgc cgcgtcgctc ccagcaacca tggctcgctg gaattcggta ccgtcatagc 120

tgtttcctg

129

<210> 41

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

cttaacatca tcagatgaag atgagtatga aatggaatcg ccaaataatta ctgataccat 60

gaagttcttt ctttatgtcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgactg 120

gccgtcgttt tac

133

<210> 42

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

catcttcac tgatgatgtt aagttgtaga tagtgaggct acctgacaca gtgtctaaat 60

aaaccctatt tttaaaagat gagaaagctc tgaattcaga attttccagt tctgcaac 118

<210> 43

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

gtaaaacgac ggccagt

17

<210> 44

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44

taaataagaat tcggcatcat gtggcagctg ct

32

<210> 45

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45

aataaaggat cctgggggtca tttgtcttga gggt

34

<210> 46

<211> 788

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(774)

<400> 46

```

gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt 48
      Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu
              1                      5                      10
cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg 96
Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val
      15                      20                      25
ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144
Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr
      30                      35                      40
ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192
Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp
      45                      50                      55                      60
ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile
              65                      70                      75
gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288
Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn
              80                      85                      90
ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336
Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp
              95                      100                      105
ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384
Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile
      110                      115                      120
cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432
His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr
      125                      130                      135                      140
tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480
Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp
              145                      150                      155
ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528
Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys
      160                      165                      170
agg ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576
Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile
      175                      180                      185
acc atc act caa ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca 624
Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
      190                      195                      200
cct ggg tac caa gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca 672
Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala
      205                      210                      215                      220
gtg gac aca gga cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca 720
Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser
              225                      230                      235
aca aga gac tgg aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa 768
Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln
      240                      245                      250
gac aaa tga ccc cag gat cc

```

788

Asp Lys

<210> 47

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

```

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1           5           10           15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
          20           25           30
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
          35           40           45
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50           55           60
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65           70           75           80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
          85           90           95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
          100          105          110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
          115          120          125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
          130          135          140
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145           150           155           160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
          165          170          175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
          180          185          190
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
          195          200          205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
          210          215          220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225           230           235           240
Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
          245          250

```

<210> 48

<211> 788

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(774)

<400> 48

```

gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt 48
      Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu
              1                      5                      10
cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg 96
Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val
              15                      20                      25
ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144
Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr
              30                      35                      40
ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192
Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp
              45                      50                      55                      60
ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile
              65                      70                      75
gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288
Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn
              80                      85                      90
ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336
Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp
              95                      100                      105
ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384
Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile
              110                      115                      120
cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432
His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr
              125                      130                      135                      140
tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480
Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp
              145                      150                      155
ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528
Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys
              160                      165                      170
agg ggg ctt gtt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576
Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile
              175                      180                      185
acc atc act caa ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca 624
Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
              190                      195                      200
cct ggg tac caa gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca 672
Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala
              205                      210                      215                      220
gtg gac aca gga cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca 720
Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser
              225                      230                      235
aca aga gac tgg aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa 768
Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln

```

240
gac aaa tga ccc cag gat cc
Asp Lys

245

250

788

<210> 49
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145 150 155 160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
165 170 175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225 230 235 240
Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
245 250

<210> 50
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

tgttggatcc tgtcaatgat gatgatgatg atgaccttga gtgatggtga t 51

<210> 51

<211> 620

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(609)

<400> 51

```

gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt 48
      Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu
      1          5          10
cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg 96
Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val
      15          20          25
ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144
Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr
      30          35          40
ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192
Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp
      45          50          55          60
ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile
      65          70          75
gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288
Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn
      80          85          90
ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336
Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp
      95          100          105
ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384
Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile
      110          115          120
cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432
His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr
      125          130          135          140
tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480
Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp
      145          150          155
ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528
Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys
      160          165          170
agg ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576

```

Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile
 175 180 185
 acc atc act caa ggt cat cat cat cat cat cat tga cag gat cc 620
 Thr Ile Thr Gln Gly His His His His His His
 190 195

<210> 52
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30
 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly His His His His His His
 195

<210> 53
 <211> 620
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(609)

<400> 53

gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt	48
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu	
1 5 10	
cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg	96
Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val	
15 20 25	
ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act	144
Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr	
30 35 40	
ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg	192
Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp	
45 50 55 60	
ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att	240
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile	
65 70 75	
gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac	288
Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn	
80 85 90	
ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg	336
Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp	
95 100 105	
ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att	384
Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile	
110 115 120	
cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca	432
His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr	
125 130 135 140	
tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac	480
Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp	
145 150 155	
ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc	528
Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys	
160 165 170	
agg ggg ctt gtt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc	576
Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile	
175 180 185	
acc atc act caa ggt cat cat cat cat cat cat tga cag gat cc	620
Thr Ile Thr Gln Gly His His His His His His	
190 195	

<210> 54

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30
 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly His His His His His His
 195

<210> 55
 <211> 9196
 <212> DNA
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 55
 tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgcgtg 60
 ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120
 attacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctatatt tggtatacat ttttgcgtaa 180
 attattcttt ttgaaagtt ttgttgtcca taatagtcta gggaacata aagttataat 240
 ttttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
 ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaattttt cagtgcctata taagttgtta 360
 cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
 atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480
 ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540

ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600
gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660
ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
tactgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780
atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttgga ttagtgcttt ttgaatttg ctttcaaata 1140
atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatatttttag cagaaatcag aataaatggt 1200
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttgtg catttaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320
cagcttttct attaatctc ttaatgataa ttttaatttg ggccatgtgg tcaaagtata 1380
tagccttgta tatgtaaag ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620
tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgta gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtgggtg ccaattgggt gatggttatg 1860
ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040

tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctcttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400
acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460
atttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580
tatgctcatt cttttgcct gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820
ctgttgaaaa atataatttc taaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat ttagcagac 2880
tttttaaag tcagtatac atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcaatctta 2940
ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaattttttt 3060
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgc tccggaatgt gggtaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtgta cagtgccttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtgggtatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540

tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
aatgtctat ggatgataat gttgtatggt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tcctcgggtg gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
agtcaggggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
cagggagggt tatgaaagt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaattttatt 4200
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
gtcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggg cagttggcta gggcttttta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggg cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gagagagag 4620
cgatttccta tttgtctctg cttattttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
ggccaatcag ccaatcagt ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920
agagtttatt cagattacat ttaaggtga taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040

gatgcatgca ttcctgtgct cagctcactt ttcctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160
catctctcca gtcctcata tggctctctta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catTTTTATA aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gttgtacac catccacagg ggTTTTATTT taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgtagcatt tagactTTTT tccttactat aattgagcta gtatTTTTgt 5520
gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagTTTTta agattcagaa 5640
caataatTTT caaaagcagt tacccaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgattTTTT 5760
tttcaaattt aggctagttc actagtgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttgcca aaatcttggt ccattctggg 5880
ttctttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940
aggatatat ttctatatc tgtatTTTT tcctctgtca tatatttgct ttctgtTTTA 6000
ttgatttcta ctgtagttt gatacttact ttcttacct ttctttggga tttatTTTgc 6060
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgccccitat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaactTTTc 6180
TTTTtaata ttccatcaa gttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctTTaaa ttaatttggt 6300
ttctatattt ttgacaatg tcaaccttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
atTTTTgt ttgatctgtt atatttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatTTTTgc ttatttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattTTTT agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgcctTTTgt 6540

tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaactt tatatagcat 6600
gttgtttgtt aggtagtga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaa 6660
atatitagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcgggt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaataactaac tccgtactat 6780
cttgttttct gtgaattaac cccttttcaa aggtttcttt tctttttttt ttttaaggac 6840
aacaagtta ttacagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
gtaaatataa tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt ttttagtta 7320
aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380
gtatgttctc ccagtctttg gcttgtattt tcatcccttc aatacatata ttttgtaat 7440
ttattttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctccctt cctccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctccc 7560
aggaaggggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggt 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga cttcctcctt caggaggtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag cccggtcttg accccttgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gtcagtgtt tagctgtggg tgtctgcac tgcttccac agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagtctc attatcagag aagggtttt 8040

aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100
acagtgcacg aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tcccttttct 8160
tgctctcatc cgttcctccc ctgactagat ctctctgctc cctcatgtcc tcctctcccc 8220
tcccccttc ccttctcttt tcttctaact ccctctcccc tccaccacag atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta tatcaggttt attttggcta gtatttgtat gtgtttgggt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatattag acacagattt aaatatattga agtttttttt 8460
tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttctttta aagaggatag cagtgcata ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttctc 8760
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttggg ttatataggc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtcc tctcttcaag 9060
caggatgatc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgtatc tctagcacc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag catttgtgtga cagagacagg 9180
aggatcccaa gagctc 9196

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56

gagacttcag cccacttcaa ttattggc

28

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57

cttgtgtgac tcttaactct cagag

25

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58

gaggccactt gtgtagcgcc aagtg

25

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

ccctcgagat aacttcgtat agc

23

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 60

ggtaggcctc actaactg

18

<210> 61
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 61
catagaaaca agtaacaaca gccag 25

<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62
gtgagtccat ggctgtcact g 21

<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63
cctgacttgg ctattctcag 20

<210> 64
<211> 235
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp
225 230

<210> 65

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

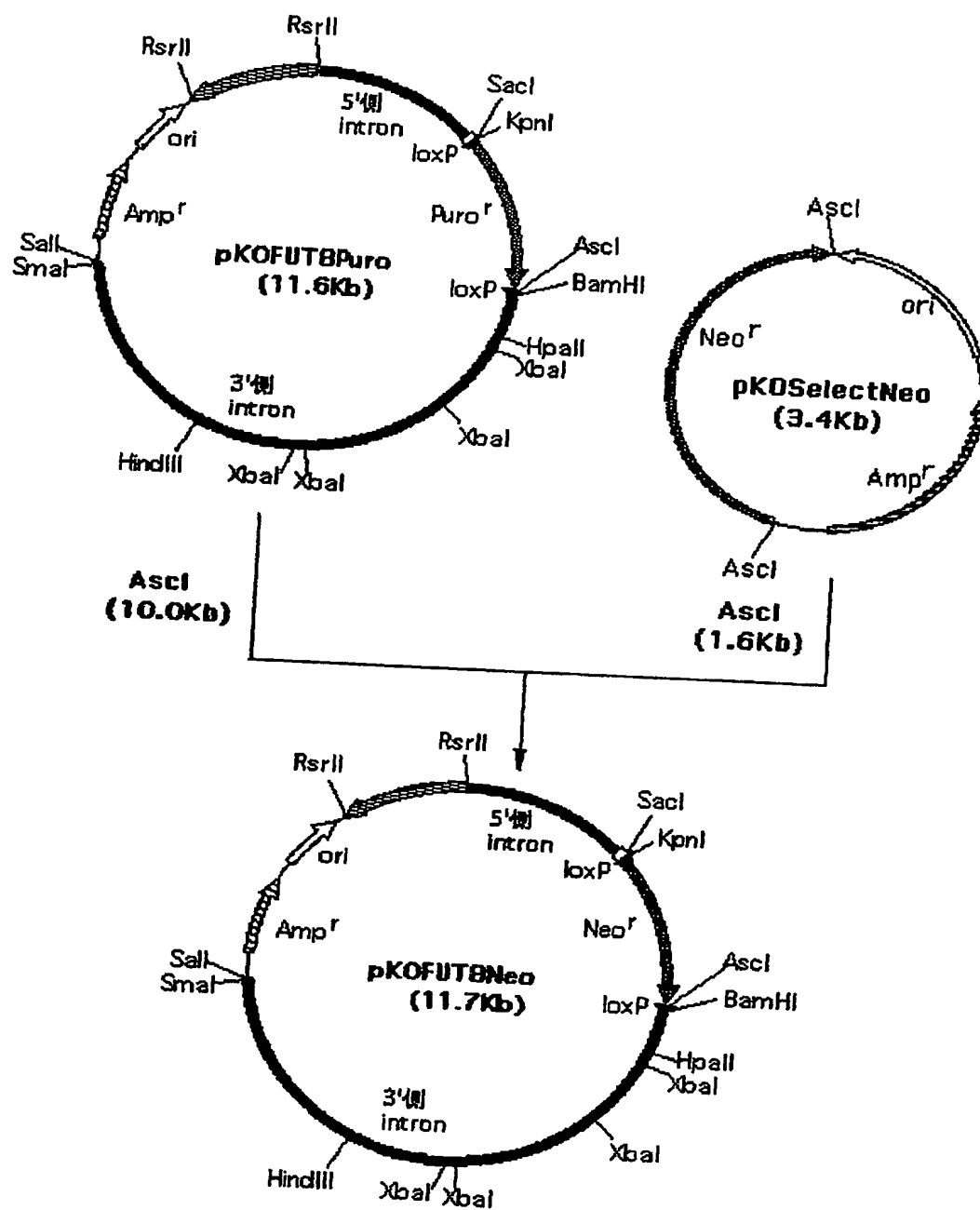
Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val
85 90

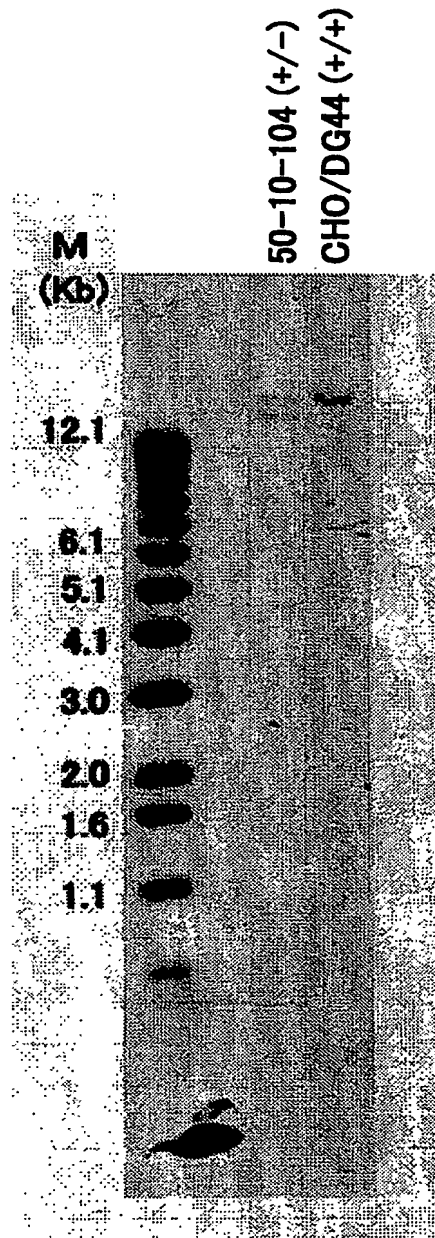
33/47

【書類名】 図面

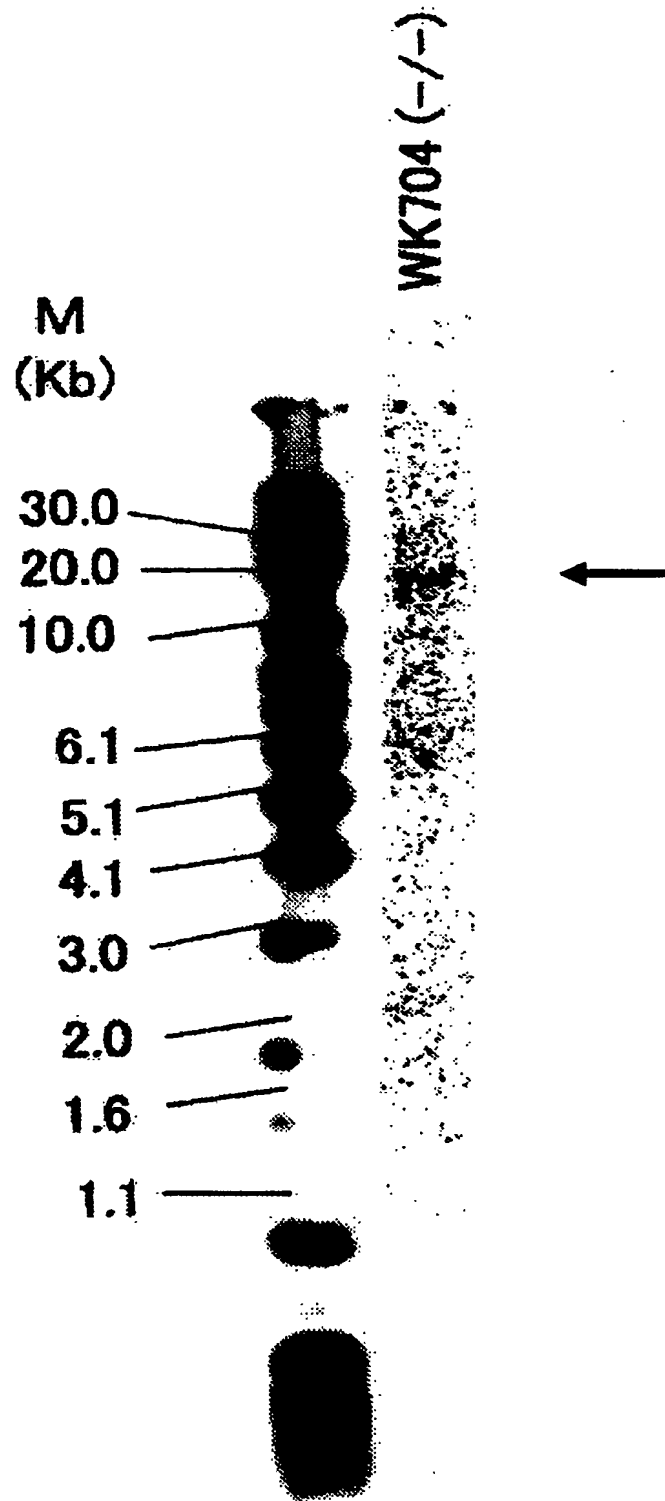
【図1】



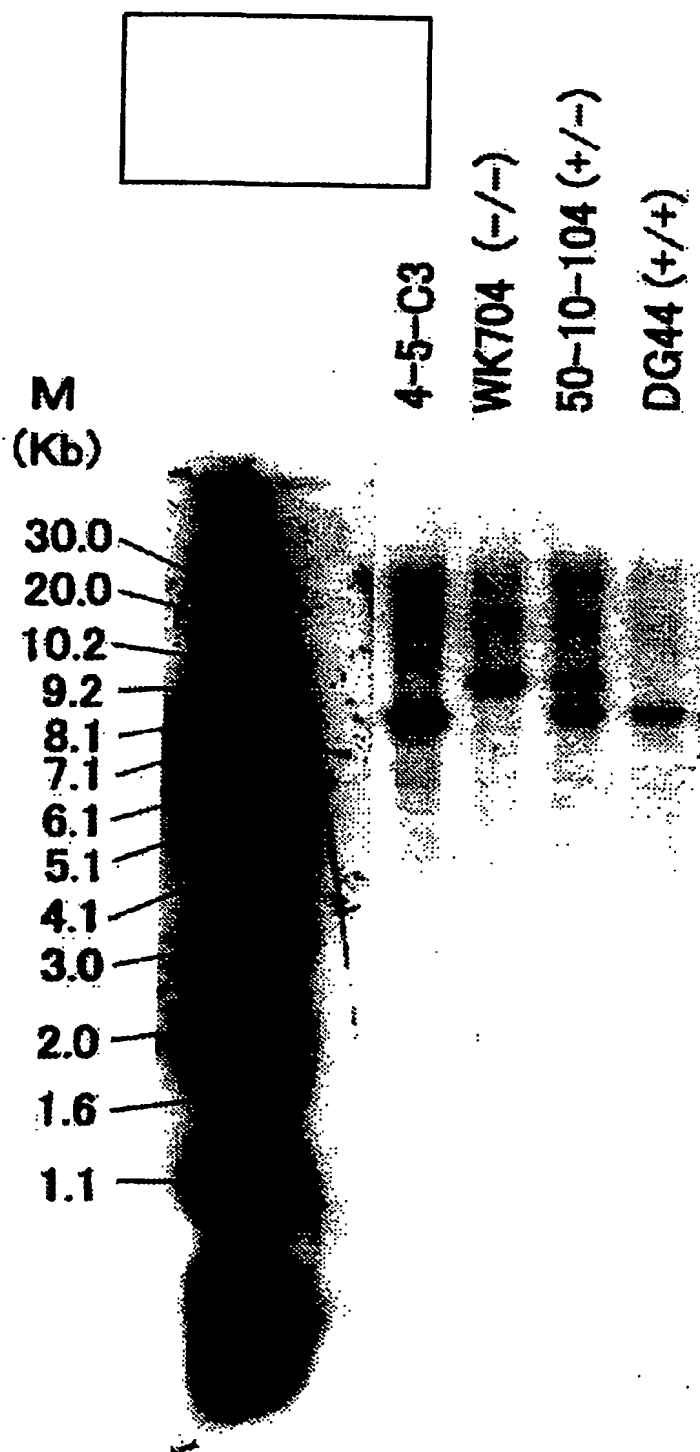
【図 2】



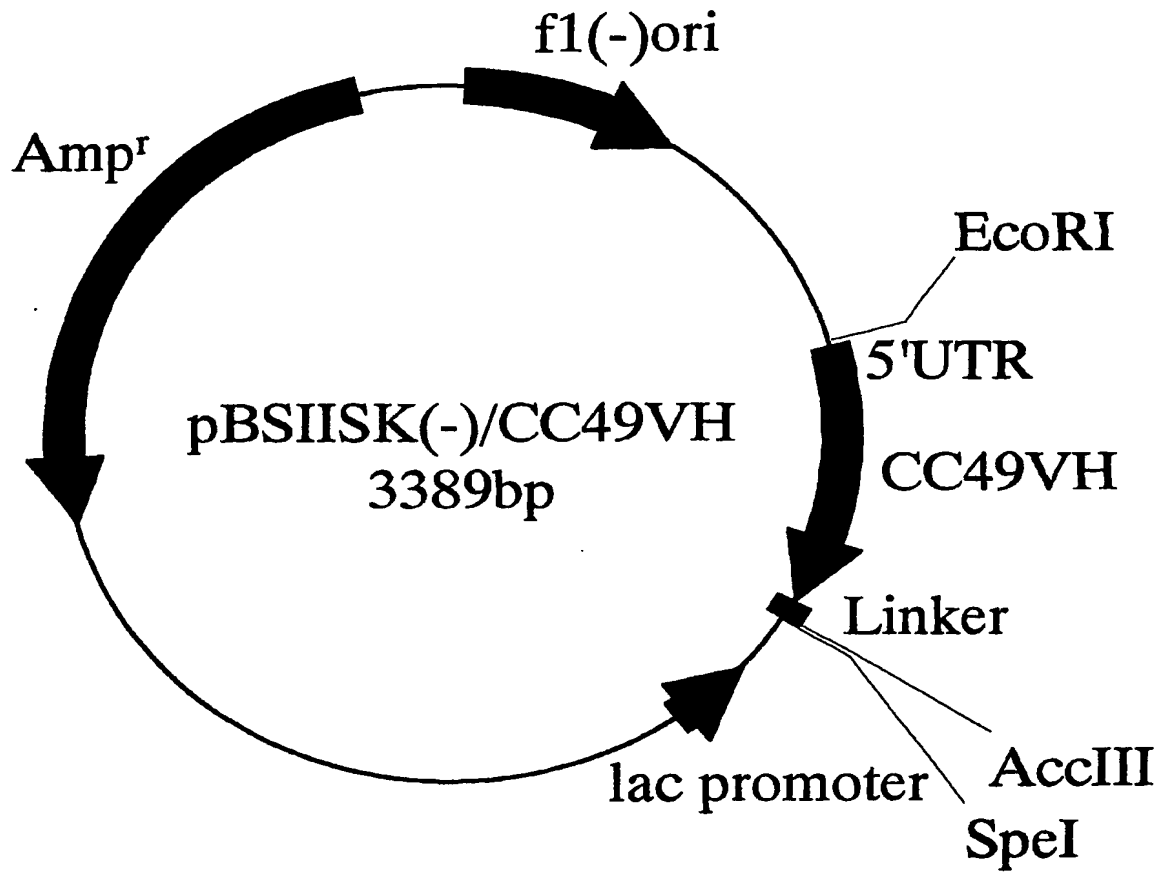
【図 3】



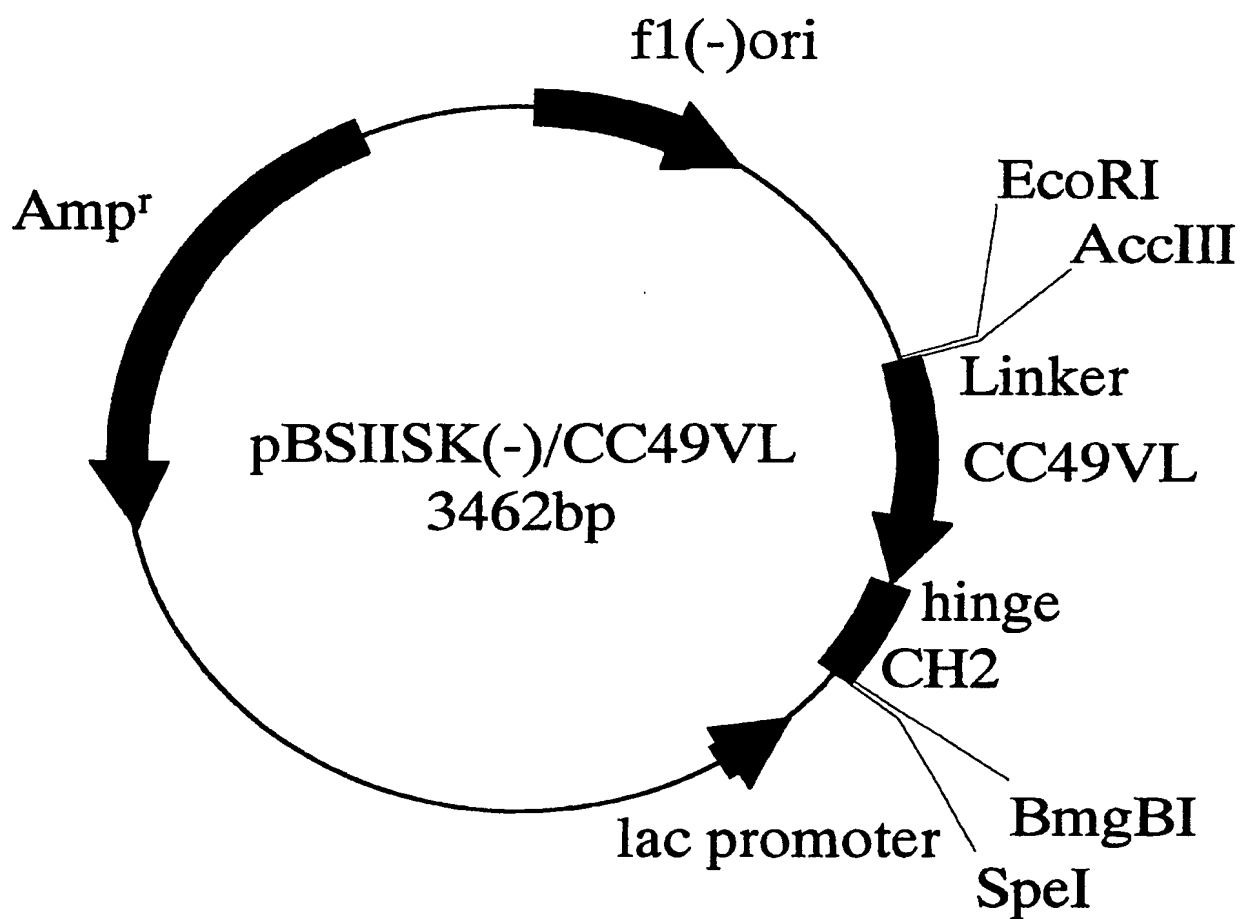
【図 4】



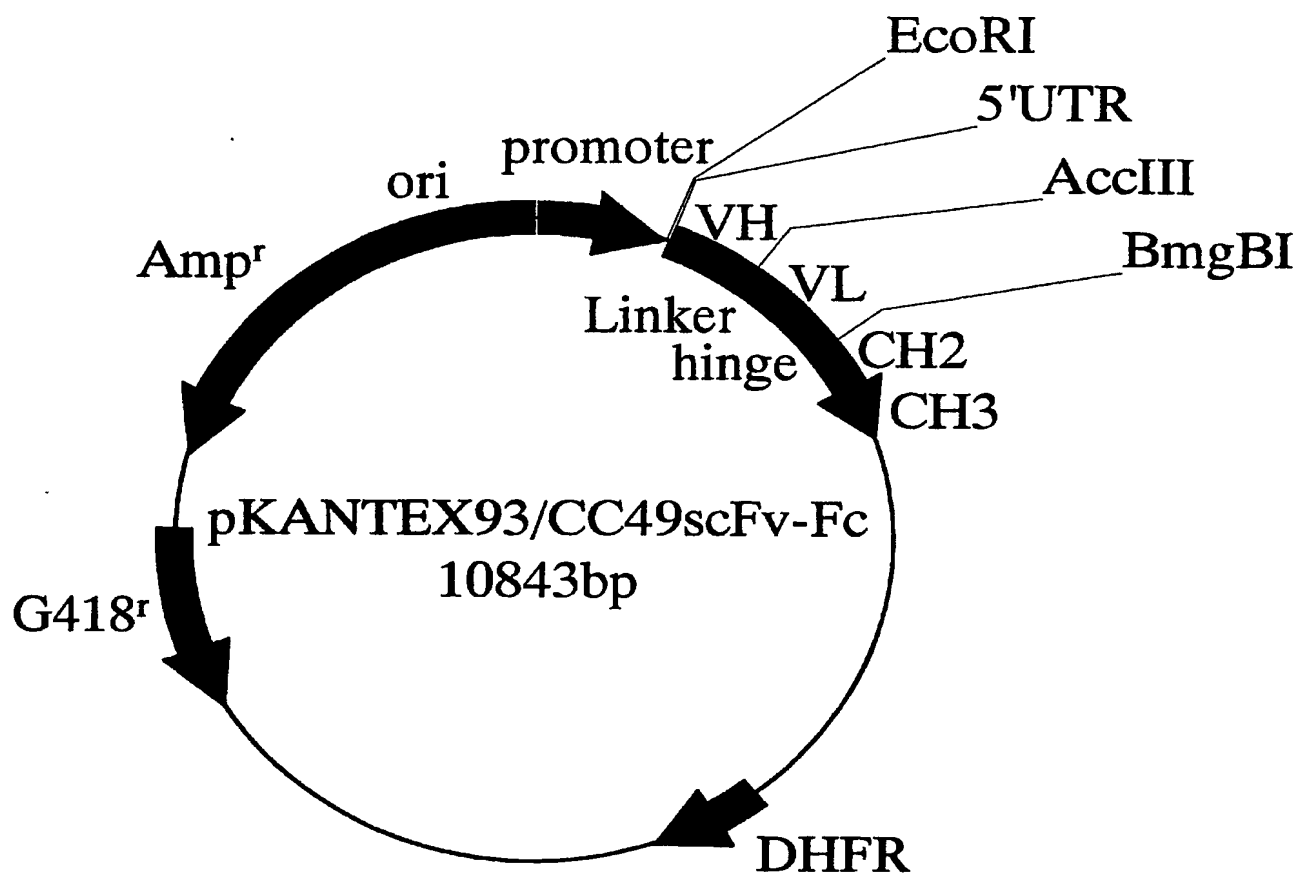
【図 5】



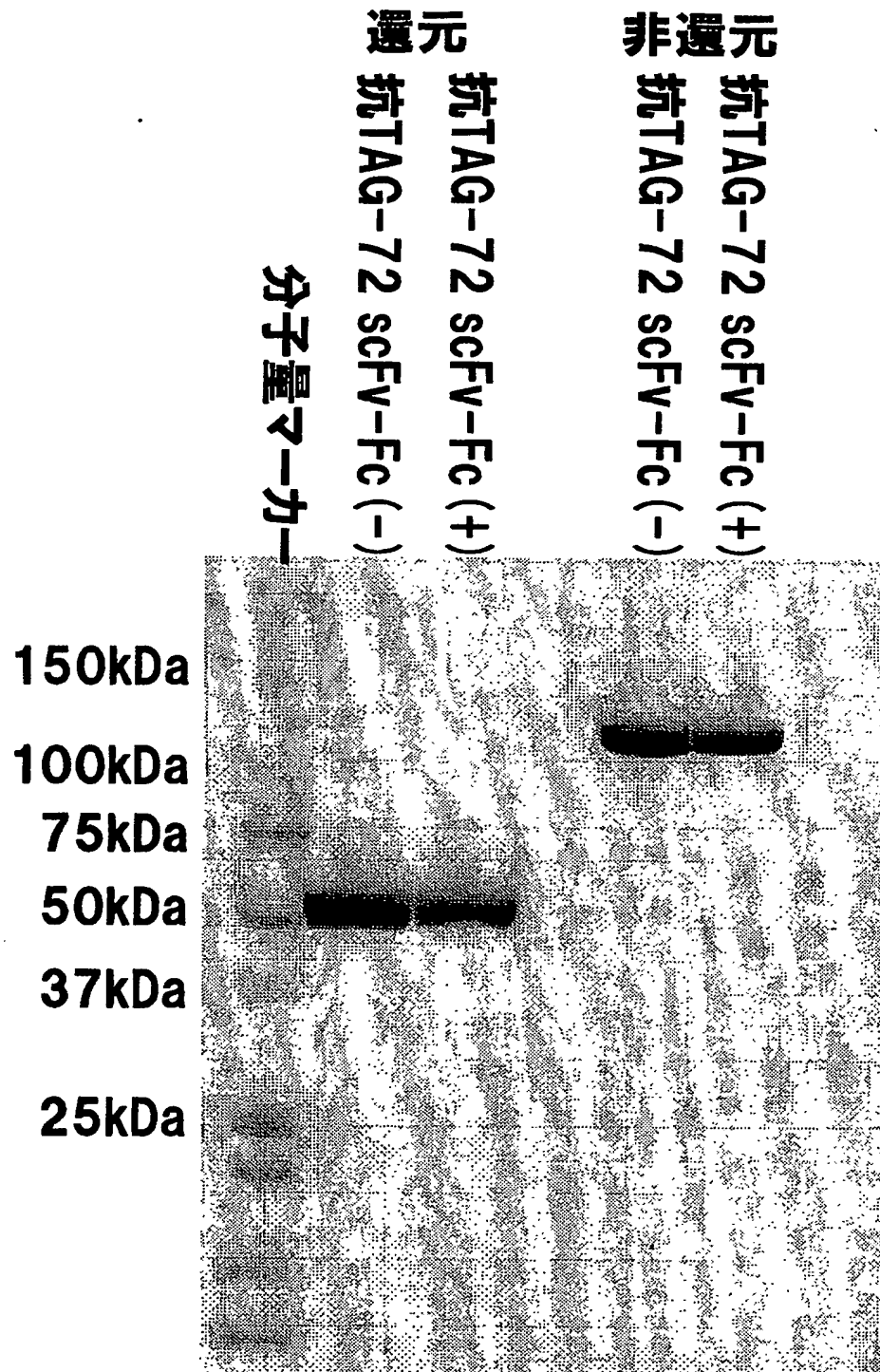
【図 6】



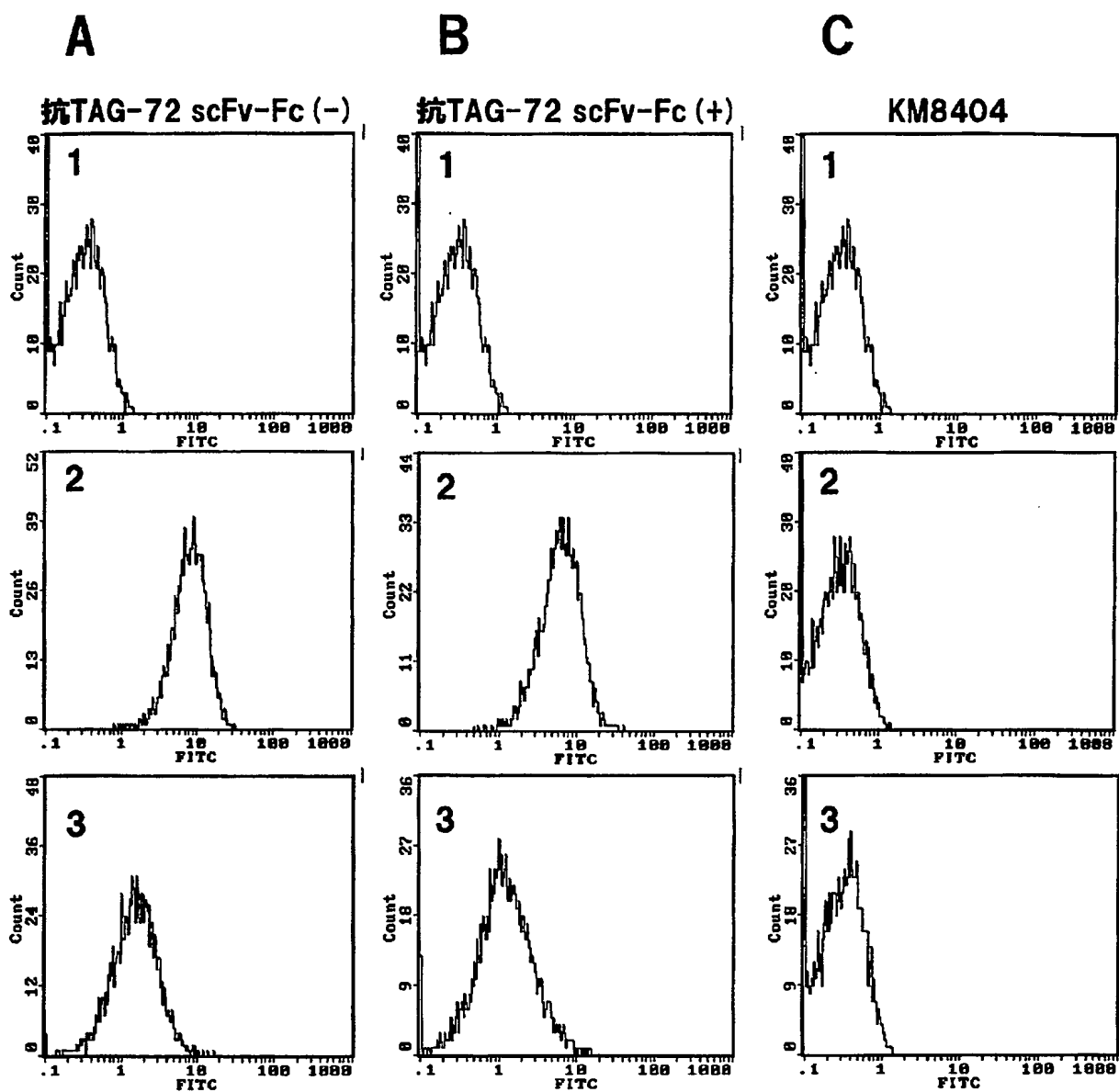
【図7】



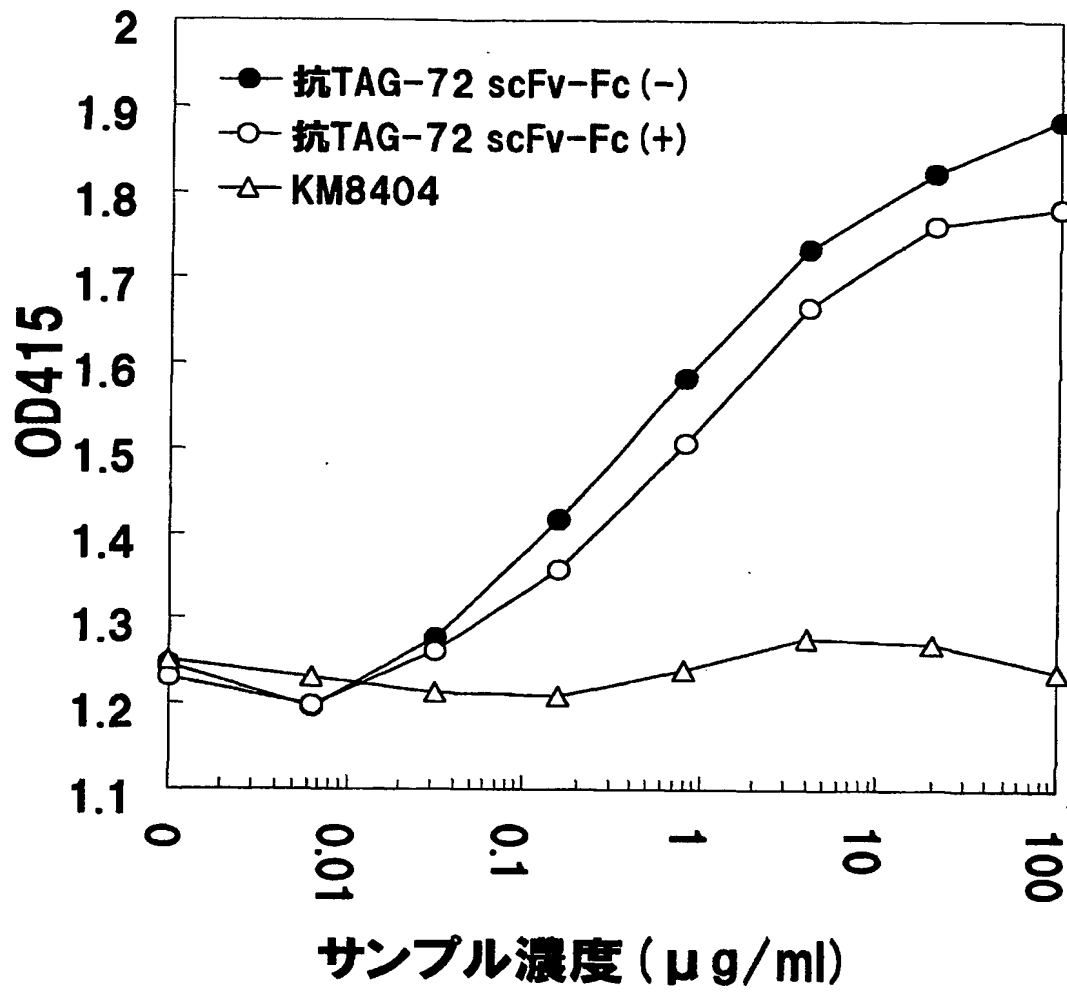
【図8】



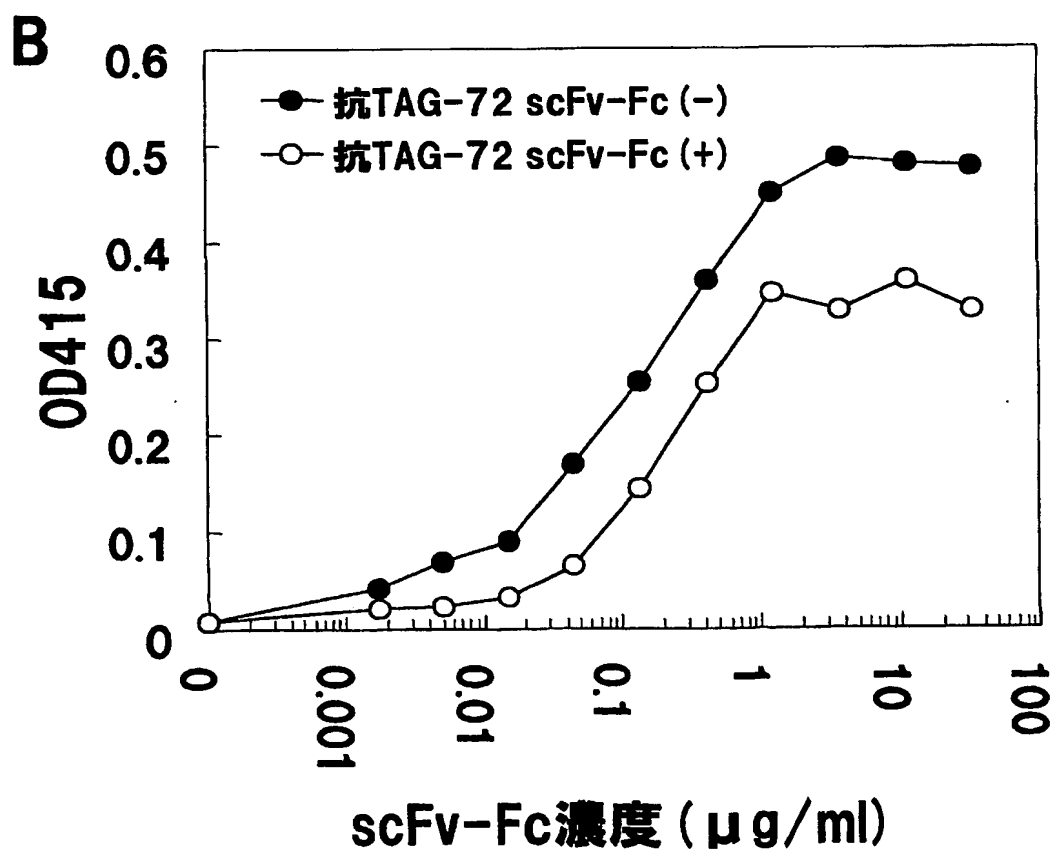
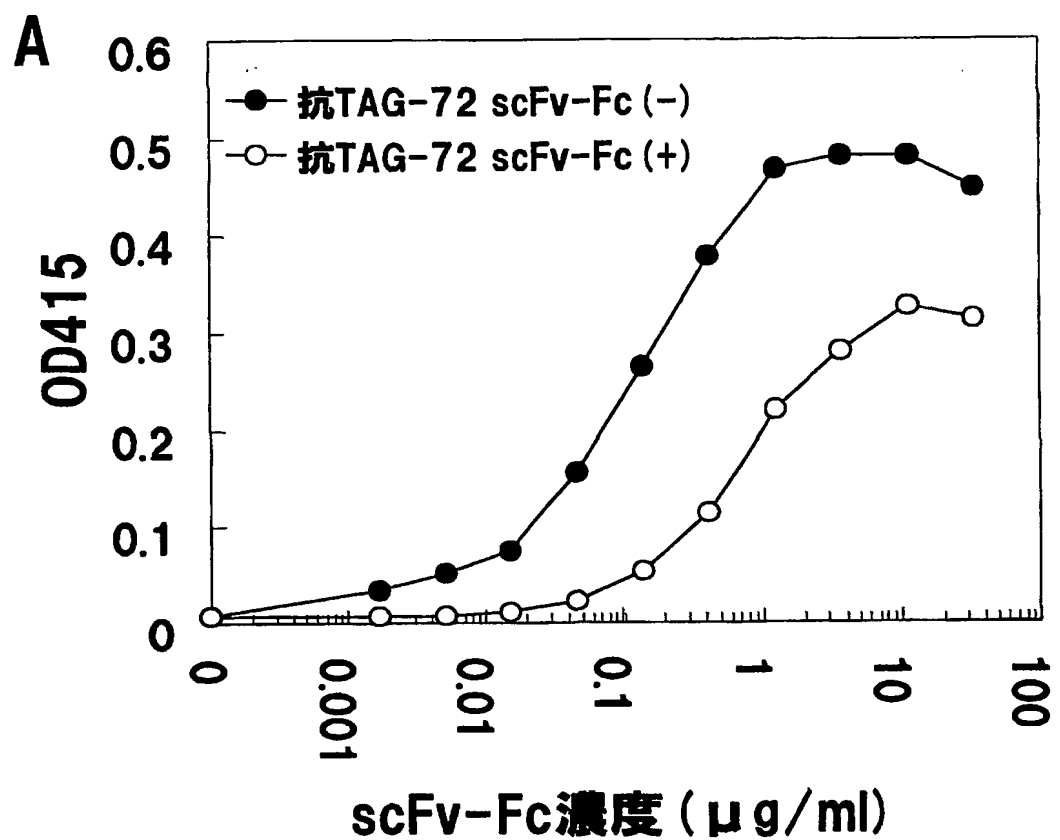
【図9】



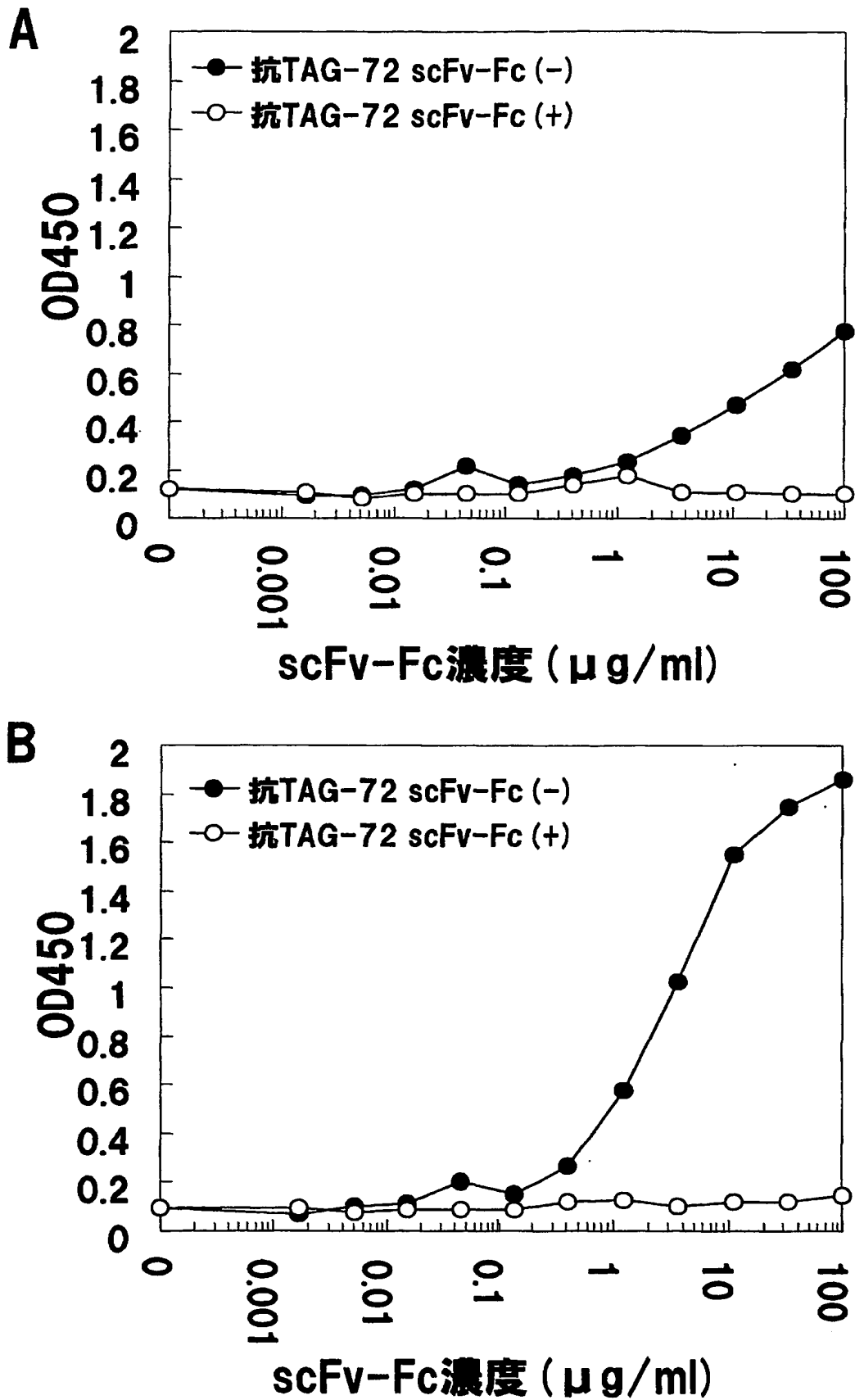
【図 10】



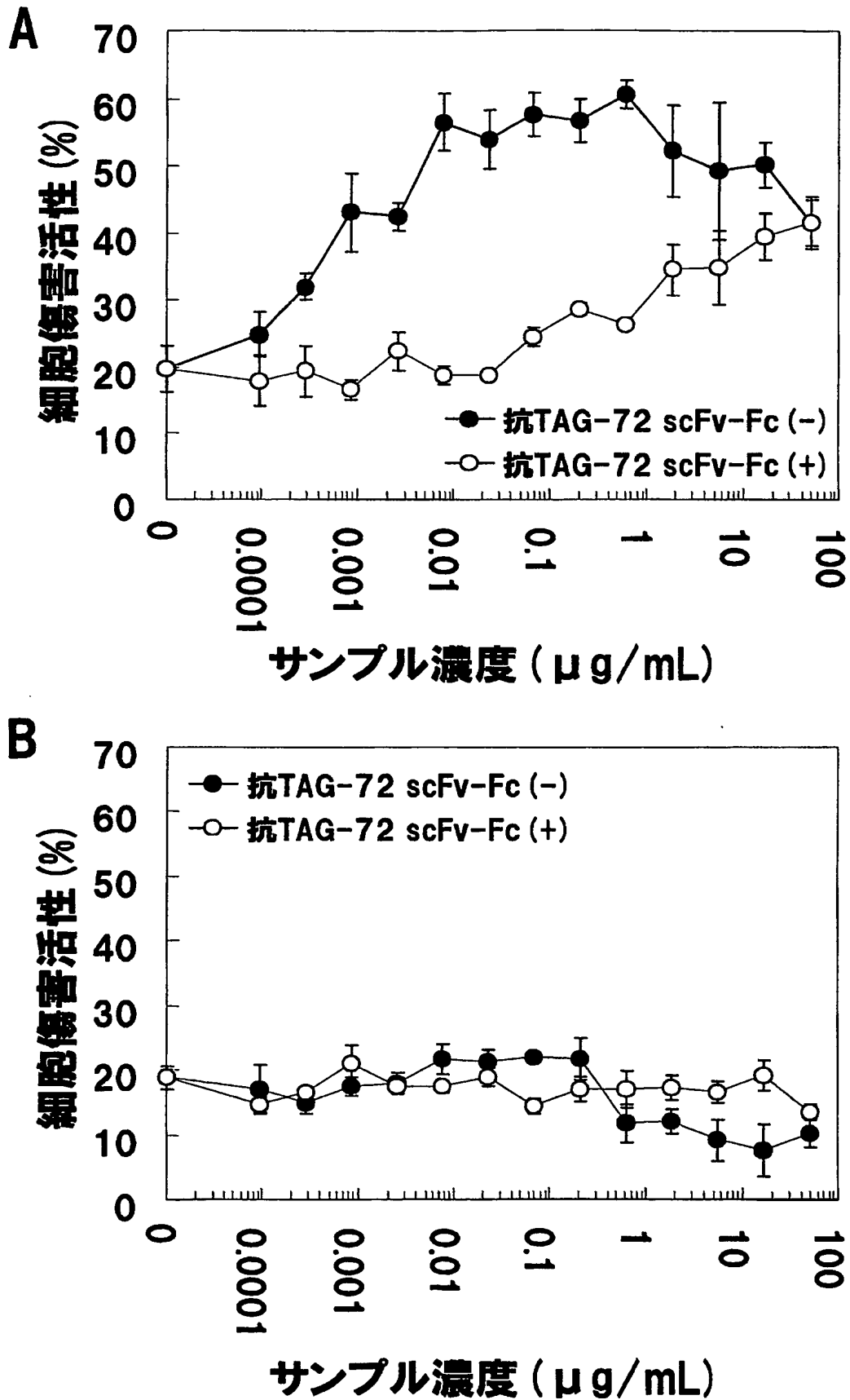
【図 11】



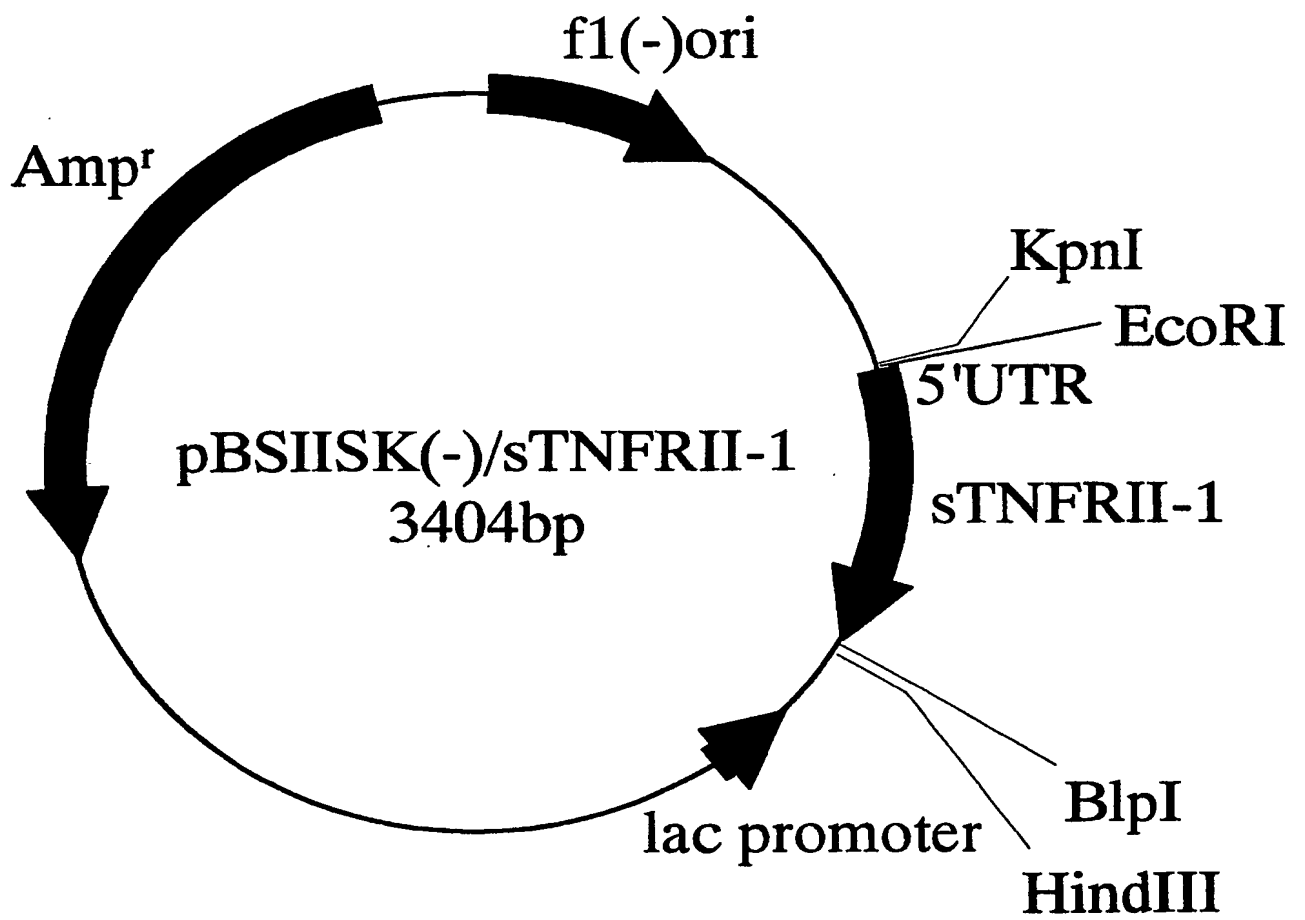
【図12】



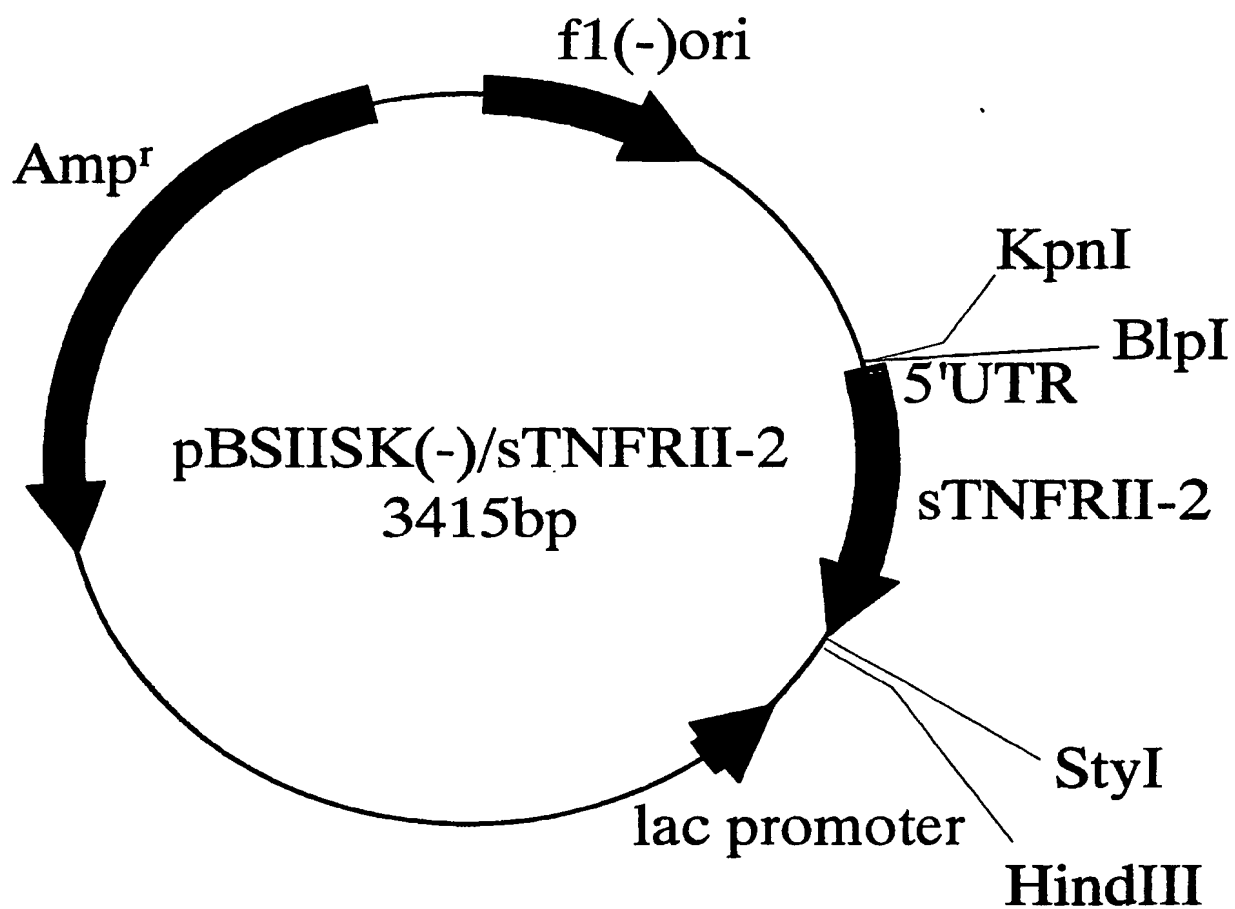
【図13】



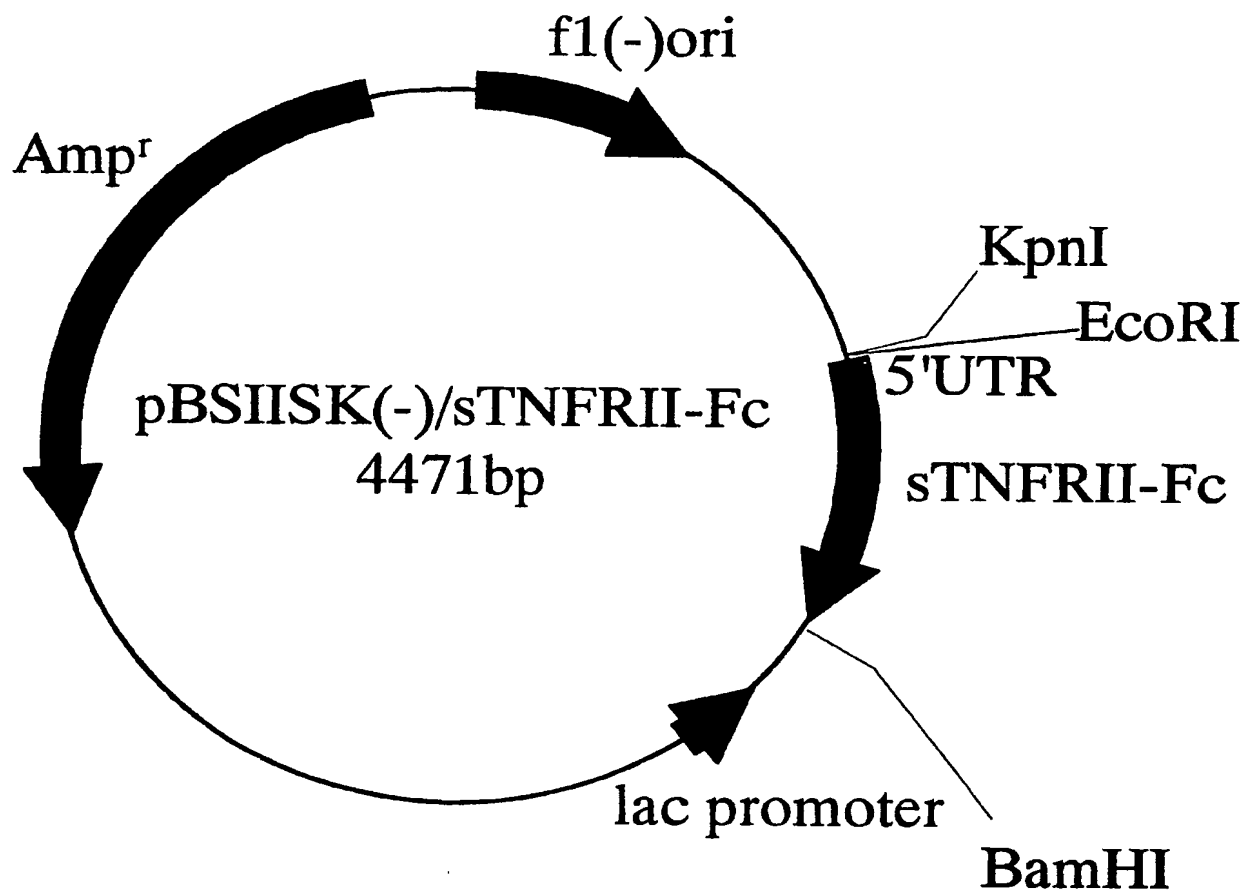
【図 14】



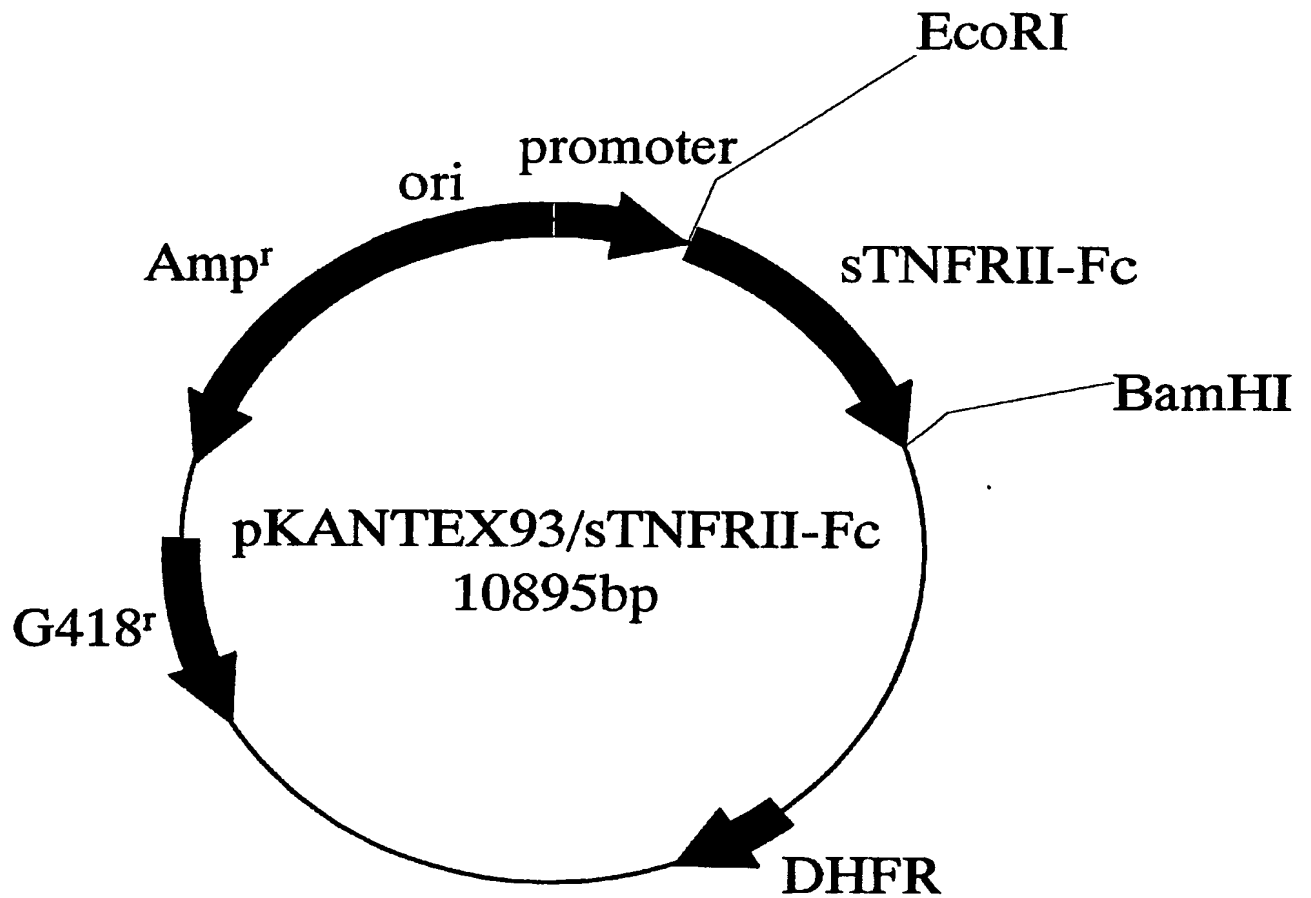
【図 15】



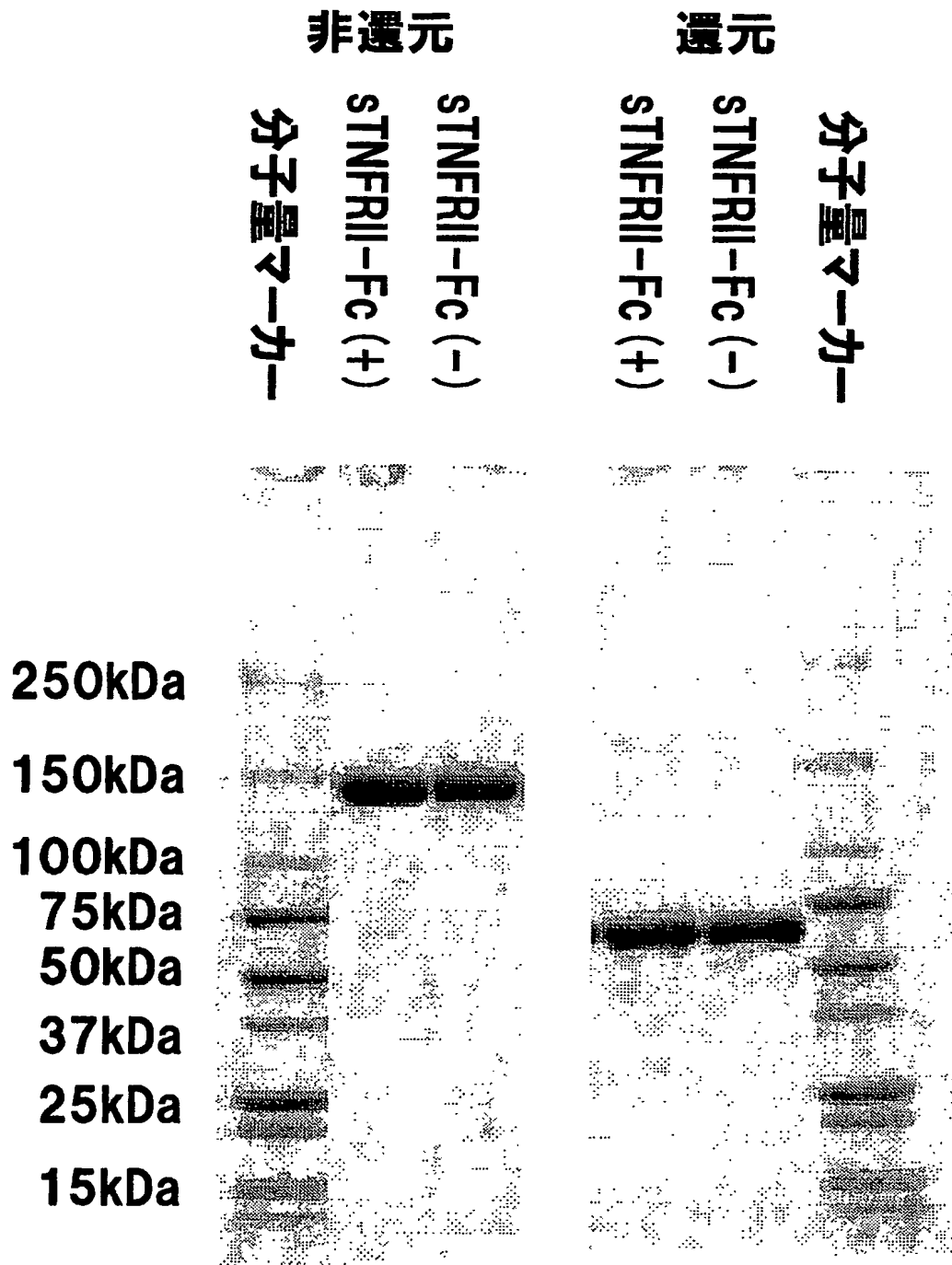
【図 16】



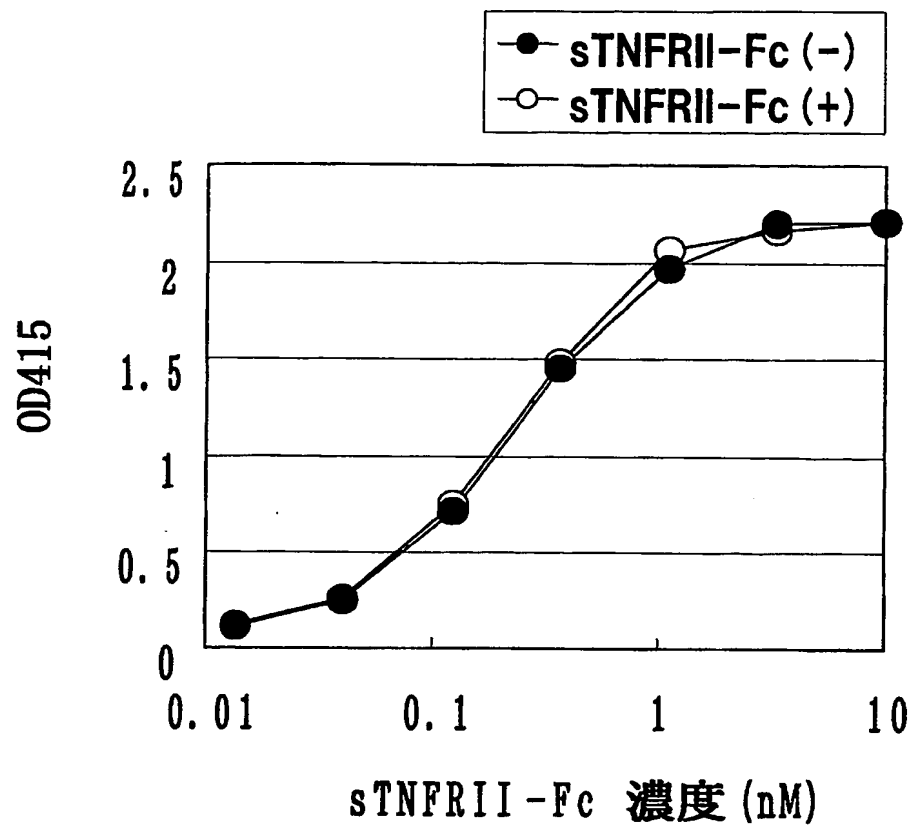
【図 17】



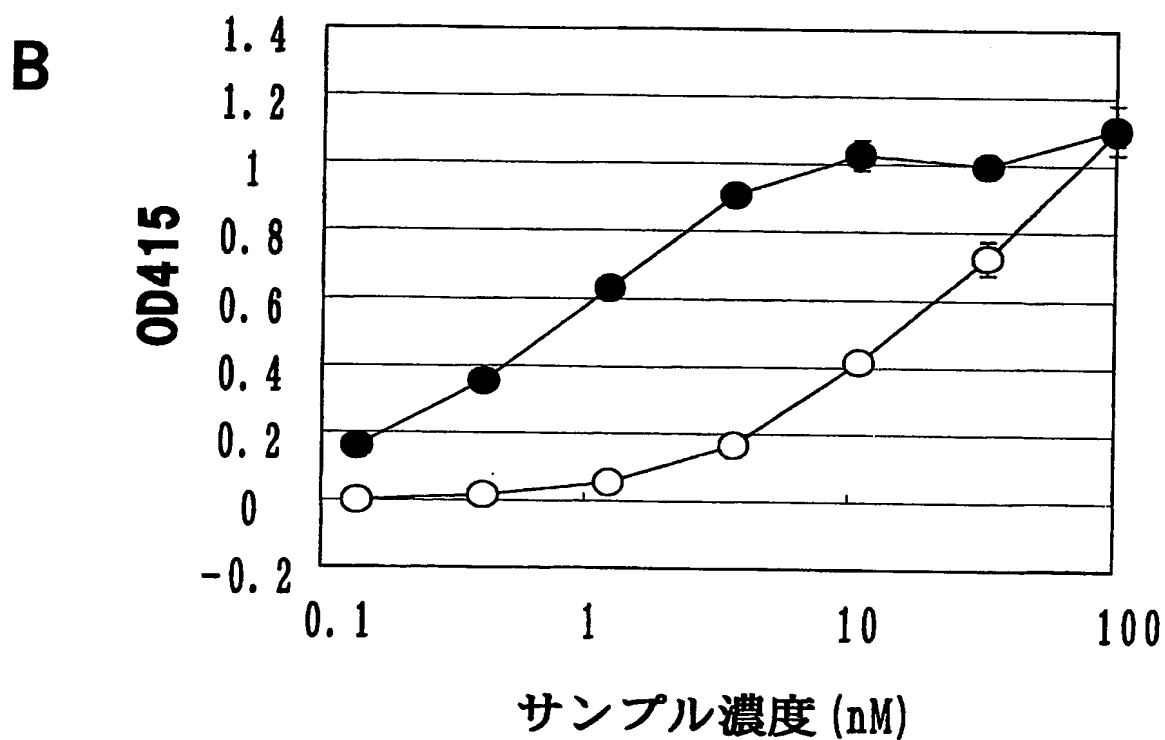
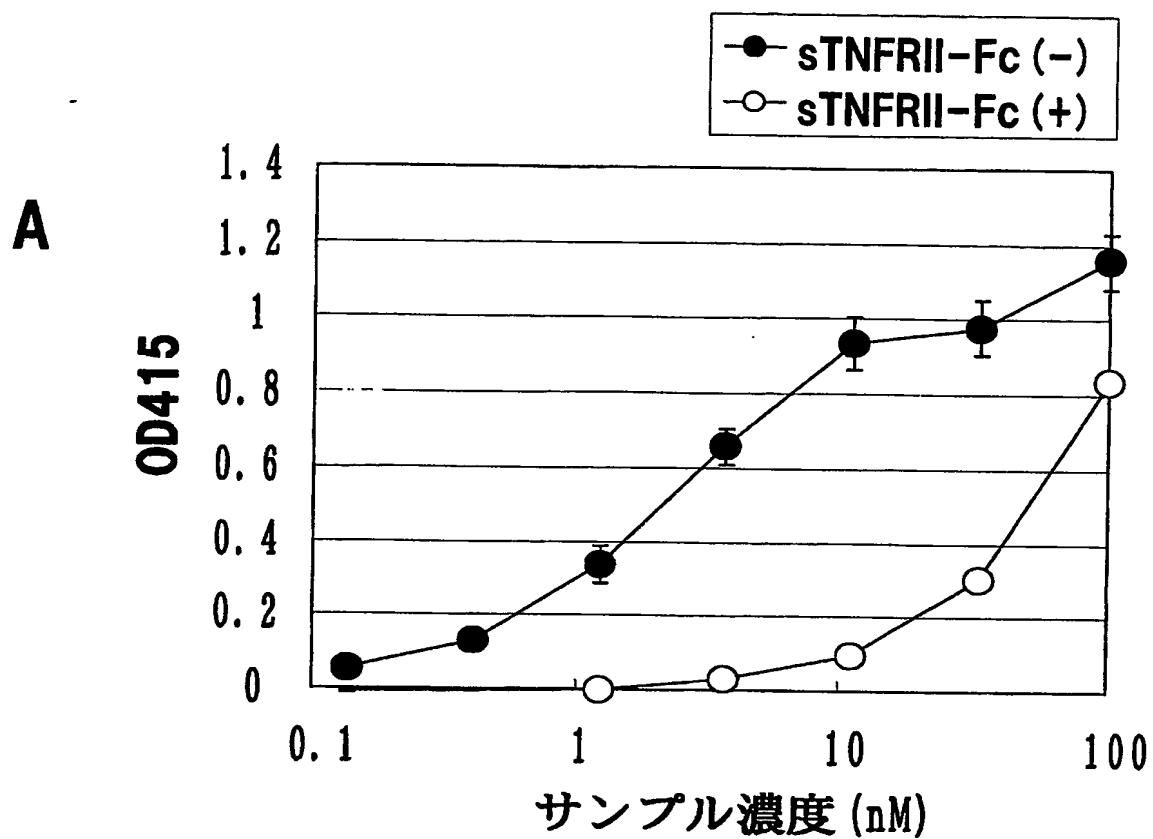
【図 18】



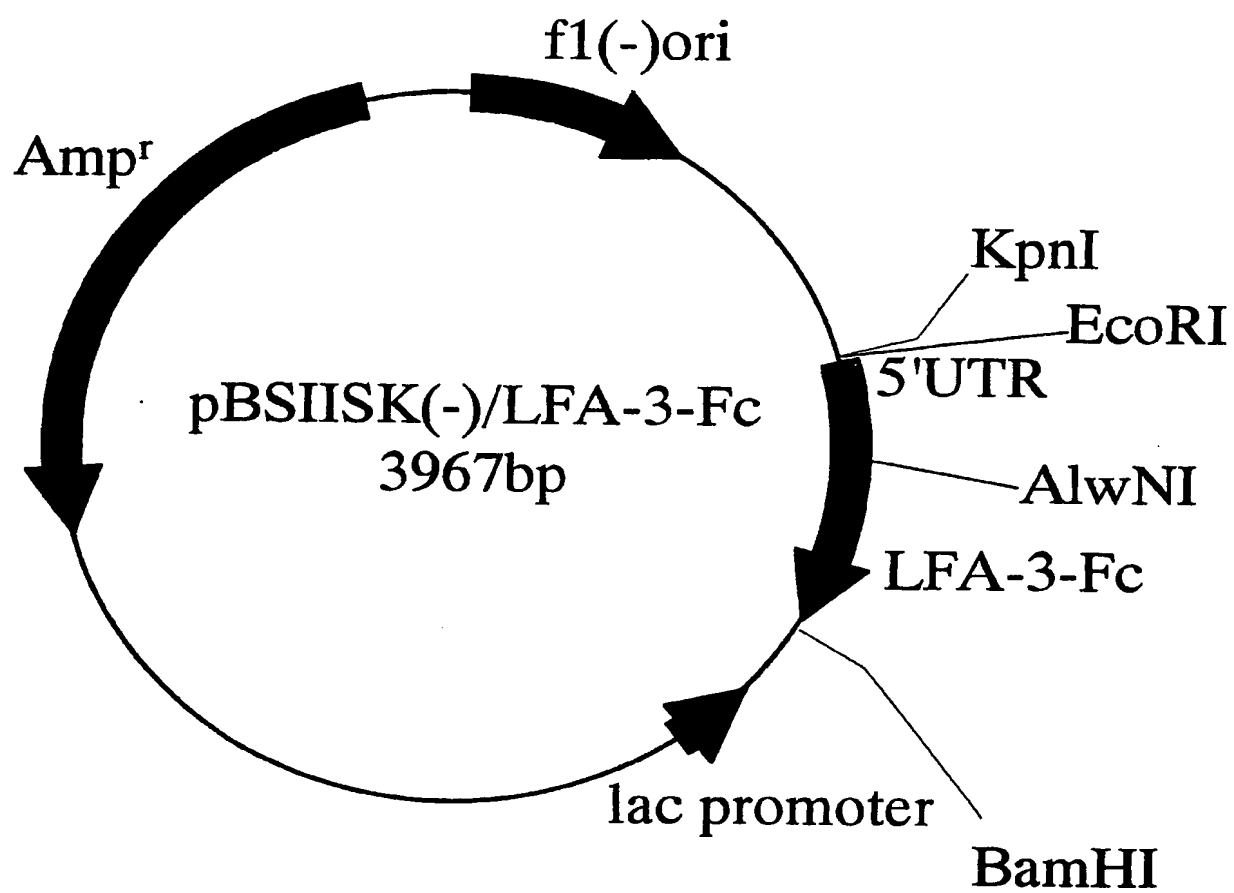
【図 19】



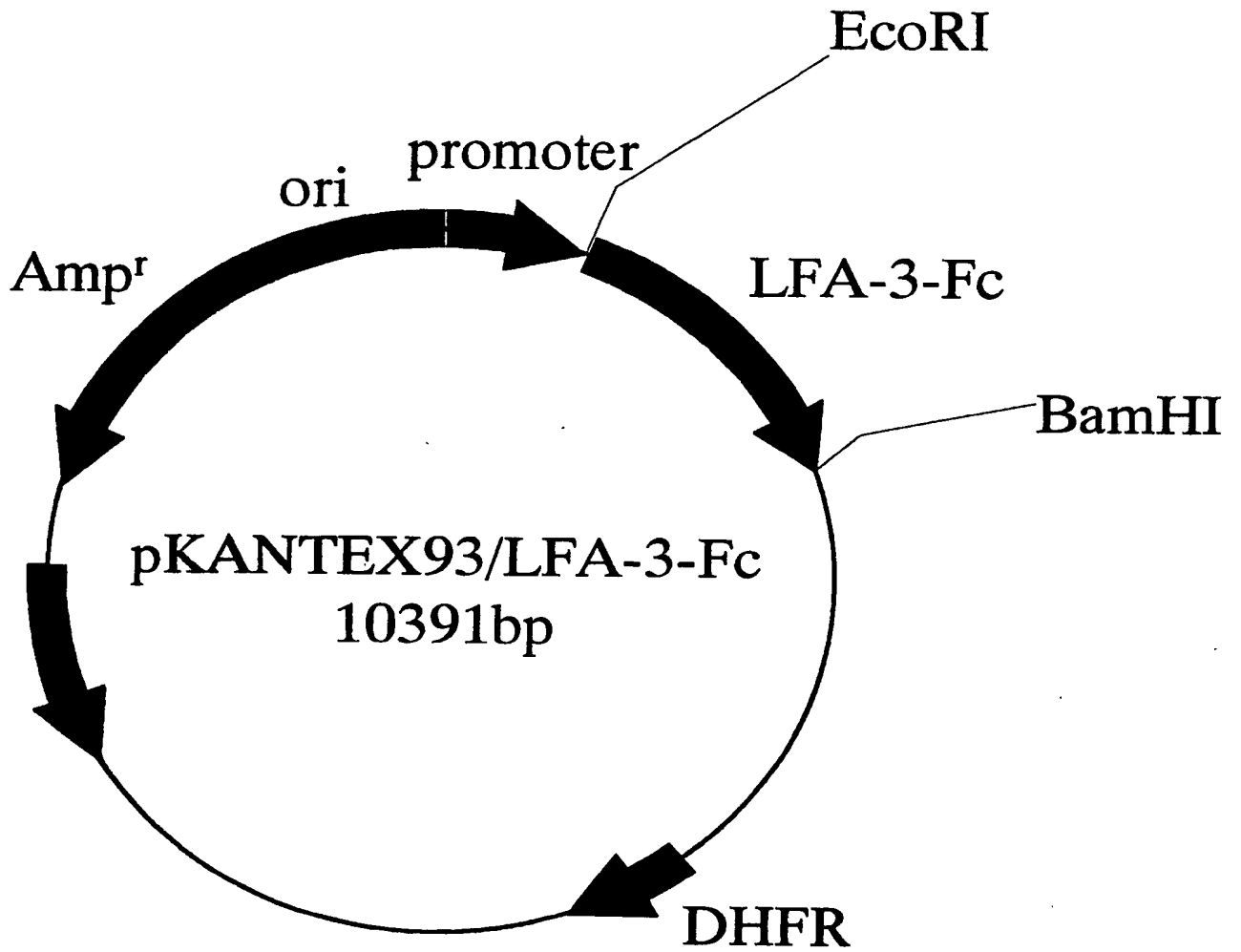
【図 20】



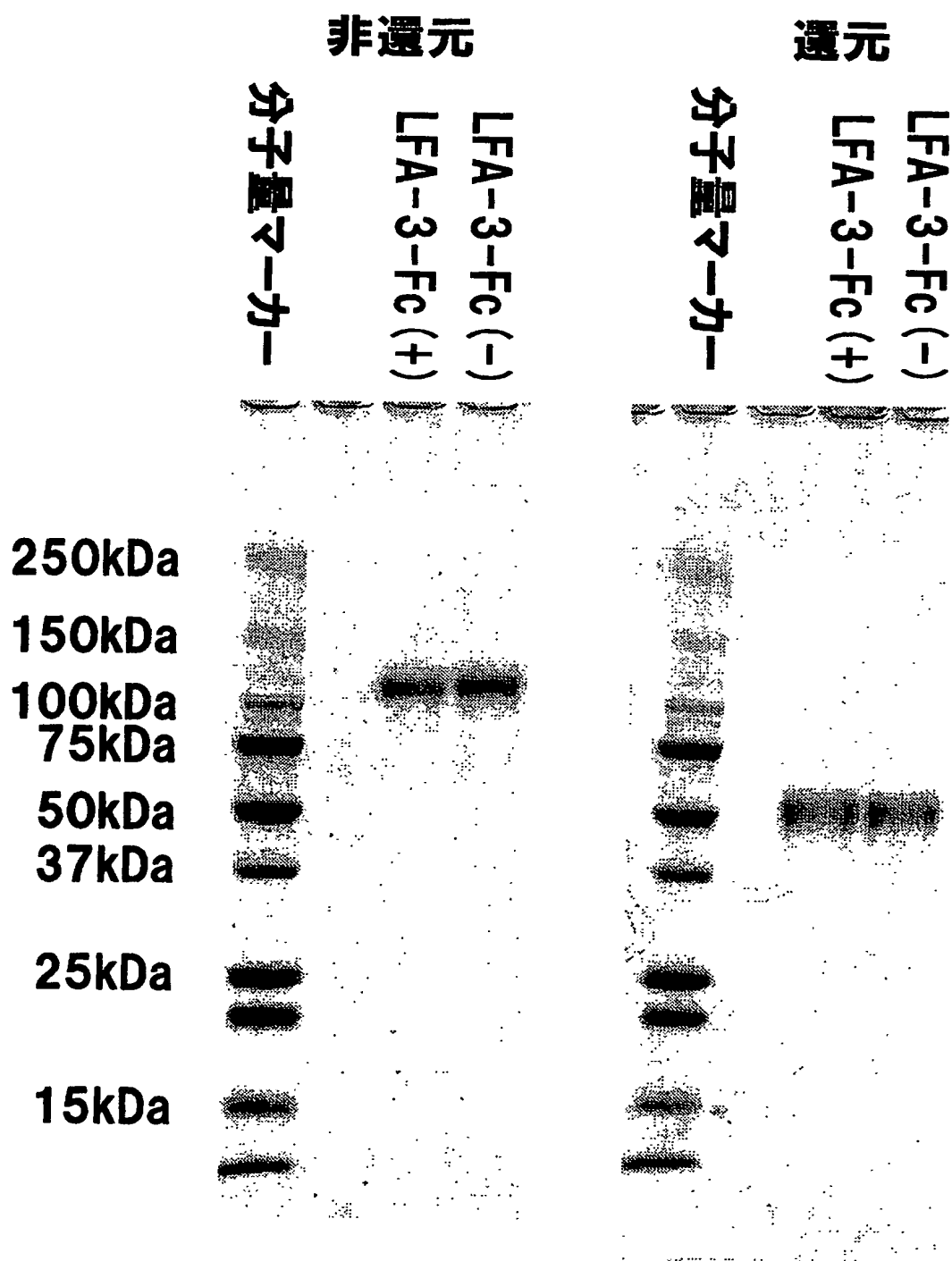
【図 21】



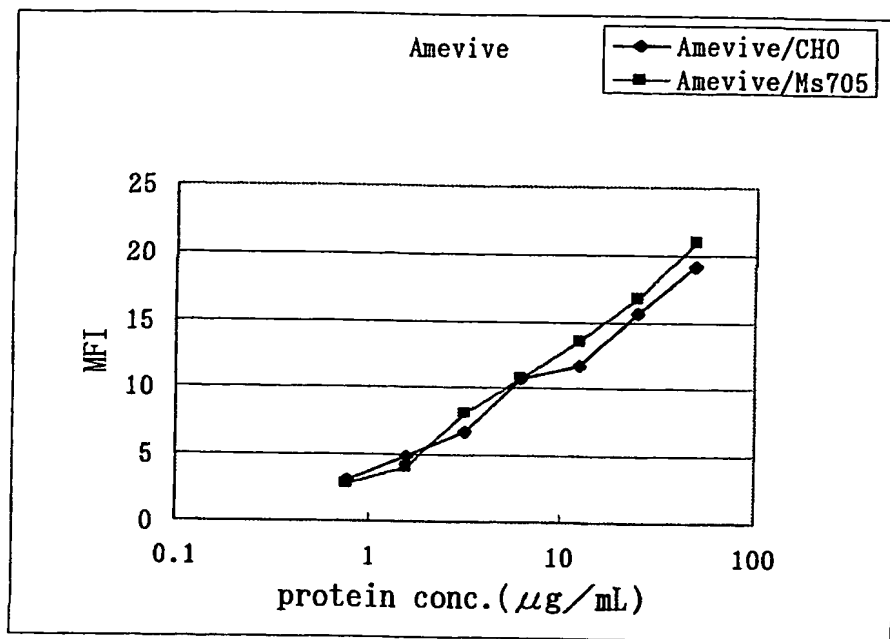
【図 22】



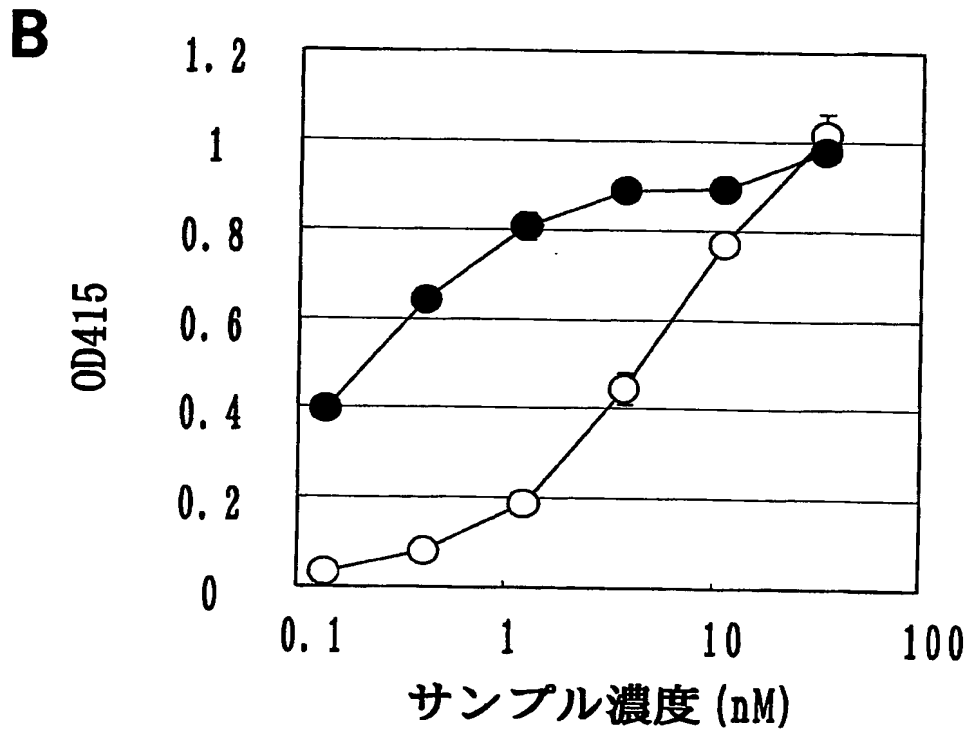
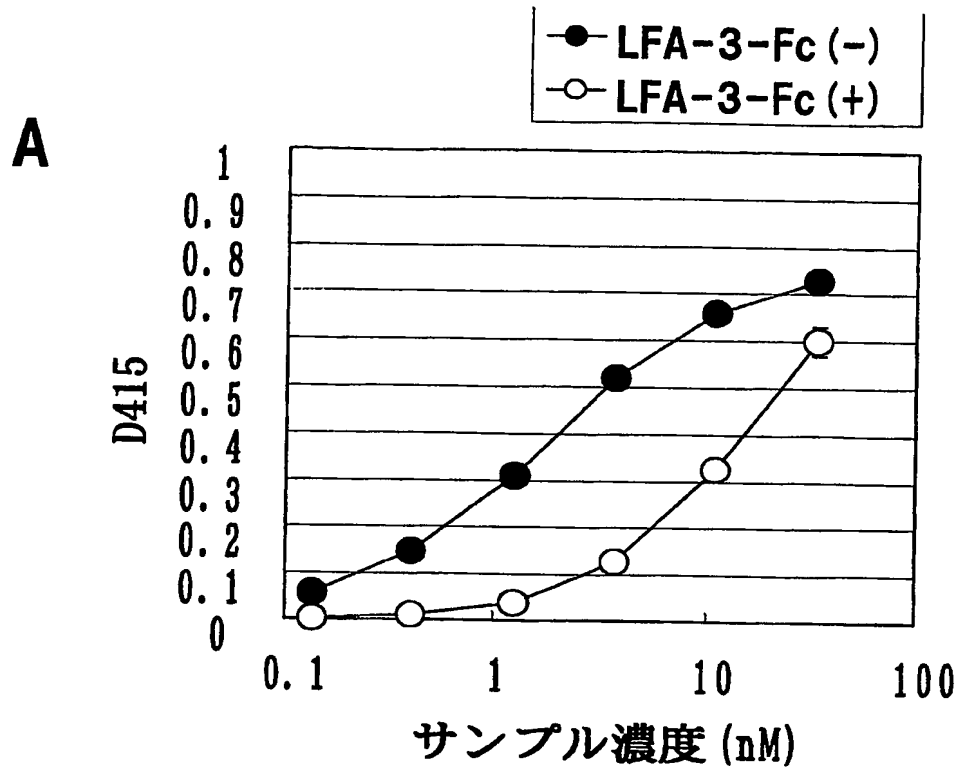
【図 23】



【図 24】



【図 25】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 エフェクター機能が増強された医薬品として有用な抗体Fc領域の融合蛋白質組成物が求められている。

【解決手段】 N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体Fc領域の融合蛋白質分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体Fc領域の融合蛋白質組成物、該抗体Fc領域の融合蛋白質組成物を生産する形質転換体、該抗体Fc領域の融合蛋白質組成物の製造方法および該抗体Fc領域の融合蛋白質組成物を含有する医薬を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 5 0 1 5 8

出 願 人 履 歴 情 報

[0 0 0 0 0 1 0 2 9]

日	1 9 9 0 年	8 月	6 日
由]	新規登録		
所	東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号		
名	協和醗酵工業株式会社		